

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Analyse und Funktion des Hyperpolarisations-aktivierten

Schrittmacherkanals HCN4

Stefan Herrmann

aus

Nürnberg

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom
15. Januar 2001 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann und Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 08.04.2004

Stefan Herrmann

Dissertation eingereicht am 08.04.2004

1. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Ludwig
2. Gutachter:	Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 19.05.2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 I _h -Kanäle.....	1
1.1.1 Die HCN Kanal Familie.....	1
1.1.2 Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle.....	2
1.1.2.1 Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung.....	3
1.1.2.2 Ionenleitfähigkeit	3
1.1.2.3 Modulation durch zyklische Nukleotide.....	4
1.1.2.4 Modulation durch pH.....	4
1.1.2.5 Homomer-/Heteromer- Bildung	5
1.2 Die Rolle von I _h im kardialen Reizleitungssystem.....	6
1.2 1 Ist I _h an der Schrittmacheraktivität im Sinusknoten beteiligt?	6
1.2 2 Ist I _h an der Modulation der Herzfrequenz beteiligt?	6
1.2 3 Besitzt I _h einen stabilisierenden Einfluss auf die Zykluslänge?	7
1.3 HCN Expression im Herzen	8
1.4 Ziel der Arbeit	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Bakterien und Plasmide.....	9
2.1.1 Verwendeter Stamm	9
2.1.2 Verwendetes Plasmid	9
2.2 Anzucht und Stammhaltung	9
2.2.1 Nährmedium und Antibiotikum	9
2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung	10
2.3 Enzymatische Modifikation von DNA.....	10
2.3.1 Restriktionsenzyme	10
2.3.2 Restriktionsverdau	10
2.4 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	11
2.4.1 Präzipitation von Nukleinsäuren	11
2.4.2 Konzentrationsbestimmung.....	11
2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion	11
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	12
2.5.1 PCR-Primer	12
2.5.2 Standardprotokoll	12
2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA Fragmenten	13

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese	14
2.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	14
2.6.3 Elektroelution	15
2.7 Sequenzreaktion	15
2.8 Isolierung von DNA	16
2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausgewebe zur Genotypisierung	16
2.8.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Mausgewebe zur Southernblot Hybridisierung	16
2.8.3 Isolierung von Plasmid DNA	17
2.9 Herstellung ³² P markierter DNA Sonden	17
2.10 Southern Hybridisierung	18
2.10.1 Hybridisierung.....	19
2.11 Isolierung und Analyse von RNA	20
2.11.1 Isolierung von Gesamt- RNA.....	20
2.11.2 Synthese von einzelsträngiger cDNA	20
2.12 <i>In-situ</i> Hybridisierung	21
2.12.1 Herstellung der RNA- Gensonden	23
2.12.1.1 <i>In-vitro</i> Transkription.....	23
2.12.2 Standardprotokoll für die <i>In-situ</i> Hybridisierung.....	23
2.12.3 Filmemulsion.....	24
2.13 Isolierung und Präparation von Proteinen	25
2.13.1 Sinusknoten	25
2.13.2 Embryoherz	26
2.14 Aufreinigung des HCN4 spezifischen Peptidantikörper	26
2.15 Analyse und Detektion von Proteinen.....	26
2.15.1 Proteinbestimmung mit BCA	26
2.15.2 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.15.3 Western-Blot	28
2.15.3.1 Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren.....	28
2.15.3.2 Immundetektion	29
2.16 Gewebepvorbereitung für die <i>in-situ</i> Hybridisierung bzw. Immunhisto- chemie	30
2.16.1 Anfertigen von Gewebeschnitten	30
2.16.2 Sinusknotenzellisolierung	30
2.17 Immunhistochemie	31
2.17.1 Immunhistologische Färbungen mittels Peroxidase.....	31
2.17.2 Immunhistologische Färbung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper	32
2.17.3 Protokoll für die Immunhistochemie.....	32
2.18 X-Gal- Färbung	33

2.19 Histologische Färbungen	33
2.20 Elektrophysiologische Untersuchungen	34
2.20.1 Isolierung der embryonalen Kardiomyozyten	34
2.20.2 Elektrophysiologisch Messung	35
2.21 Versuchstiere	35
2.21.1 „Geflochte“ HCN4 (<i>HCN4^{L2}</i>) Mäuse	35
2.21.2 Zuchtschema zur Generierung einer HCN4-defizienten Maus	36
2.21.3 Zuchtschema zur Generierung konditional HCN4-defizienter Mäuse	36
2.21.4 Kontrollierte Verpaarung	37
2.21.5 Haltung und Zucht der Mäuse	37
2.22 Tamoxifen Zubereitung	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Generierung einer HCN4-defizienten Mauslinie	38
3.2 Analyse der ubiquitär HCN4-defizienten Mäuse	39
3.2.1 Ubiquitär HCN4-defiziente Mäuse sterben <i>in-utero</i>	39
3.2.2 HCN4-defiziente Mäuse sterben in der Embryonalentwicklung zwischen Tag 10 und 11,5	39
3.2.3 Molekularbiologische Überprüfung des Knock-out Ereignisses	40
3.3 Analyse des HCN4 Expressionsmusters in der Embryonalentwicklung	42
3.3.1 Analyse der HCN4 mRNA Expression mittels <i>in-situ</i> Hybridisierung	42
3.3.2 Untersuchung der HCN mRNA Expression im embryonalen Herzen mittels RT-PCR	43
3.3.3 Analyse der HCN4 Proteinexpression	44
3.3.3.1 HCN4 Protein im embryonalen Herzen	44
3.3.3.2 Analyse der HCN4 Proteinexpression mittels Immunhistochemie	45
3.4 Histologische Untersuchung der HCN4-defizienten Embryonen	47
3.5 Funktionelle Analyse der HCN4-defizienten Embryonen	48
3.5.1 Physiologische Untersuchung der embryonalen Herzfrequenz	48
3.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an embryonalen Kardiomyozyten	49
3.5.2.1 HCN4-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine signifikante Reduktion im I_h -Strom	49
3.5.2.2 In HCN4 ^{-/-} -Kardiomyozyten ist kein sinusnotenähnliches Aktionspotential zu detektieren	50
3.6 Generierung eines herzspezifischen HCN4-defizienten Mausembryos	52
3.6.1 Charakterisierung der MLC2a Cre-Aktivität während der Embryogenese	52
3.6.2 Die herzspezifischen HCN4 ^{-/-} -Embryonen sterben während der selben Entwicklungsphase wie die global HCN4-defizienten Tiere	53
3.7 Expressionsmuster von HCN4 im kardialen Reizleitungssystem der adulten Maus	54

3.7.1 Nachweis von HCN4-Kanälen im Sinusknoten der Maus mittels Western- Blot-analyse	55
3.7.2 Analyse der HCN4 Expression im Sinusknoten mittels Immunhistochemie	56
3.7.3 Nachweis von HCN4-Kanälen in einzelnen, isolierten Sinusknotenzellen	57
3.7.4 Nachweis von HCN4 im AV-Knoten und den Herzklappen	58
3.8 Deletion von HCN4 im Sinusknoten adulter Mäuse	59
3.9 Charakterisierung von geeigneten Cre-Mauslinien	59
3.9.1 Charakterisierung der GTEV49 Cre-Linie	60
3.9.2 Charakterisierung der MHC-Cre Linie	61
3.9.3 Charakterisierung der ROSA Cre-Linie	62
3.9.4 Charakterisierung der MCK Cre-Linie	63
3.9.5 Charakterisierung der MerCreMer-Linie	63
3.10 Generierung eines sinoatrialen HCN4 KO mittels der MerCreMer-Mauslinie	65
3.10.1 Nachweis der HCN4 Proteinreduktion im Sinusknoten	65
3.10.1.1 Western-Blot Analyse	65
3.10.1.2 Immunhistochemische Analyse	66
3.11 Vorläufige funktionelle Analyse der adulten sinoatrialen HCN4 KO	67
4 Diskussion.....	68
4.1 HCN4 in der embryonalen Herzentwicklung	68
4.2 HCN4 im Herz des erwachsenen Tieres	72
4.3 Die Funktion von HCN4 im Sinusknoten	73
4.4 Ausblick	75
5 Zusammenfassung	76
6 Anhang	77
6.1 Primer	77
6.1.1 Für die Genotypisierung verwendete Primer	77
6.1.2 Für Sequenzierung/ cDNA-Amplifikation verwendeten Primer	78
6.2 Verwendete Antikörper	78
7 Literaturverzeichnis.....	79
7.1. Zitierte Veröffentlichungen	79
7.2. Eigene Veröffentlichungen	84

Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Schematisches Modell eines HCN-Kanals	2
Abb. 1.2	Modell für die Modulation des Schrittmacherpotentials	7
Abb. 2.1	Aufbau eines Southern-Blots.....	18
Abb. 2.2	Schema zur Methode der <i>In-situ</i> Hybridisierung.....	21
Abb. 2.3	"Semidry" Blot Aufbau	29
Abb. 2.4	Generierung eines globalen HCN4 Knock-out.....	36
Abb. 2.5	Schema zur Generierung eines konditionalen HCN4 Knock-out.....	36
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der Generierung HCN4-defizienter Mäuse mit Hilfe des Cre <i>loxP</i> Systems	38
Abb. 3.2	Genotypisierung	39
Abb. 3.3	Southern Blot mit embryonaler DNA.....	41
Abb. 3.4	RT-PCR aus embryonaler RNA	41
Abb. 3.5	<i>In-situ</i> Hybridisierung mit HCN4 spezifischer RNA-Sonde	42
Abb. 3.6	RT-PCR auf HCN Isoformen aus embryonalem Herzen.....	43
Abb. 3.7	Western-Blot (HCN4-AK Test).....	44
Abb. 3.8	Western Blot Analyse von embryonalen Mausherzen.....	45
Abb. 3.9	Expression von HCN4 Protein im Mausembryo 10,5 p.c.	45
Abb. 3.10	Histologische Untersuchung von Wildtyp und Knock-out Embryonen	47
Abb. 3.11	Herzfrequenz von isolierten embryonalem Herzen, ET 9,5	48
Abb. 3.12	I _h -Messung an isolierten Kardiomyozyten	50
Abb. 3.13	Aktionspotentiale in isolierten Kardiomyozyten	51
Abb. 3.14	Nachweis der Cre-Aktivität durch lacZ Färbung (MLC2aCre).....	53
Abb. 3.15	Herzspezifische Deletion von HCN4 führt zur gleichen embryonalen Letalität wie globale Deletion	54
Abb. 3.16	HCN4 Protein im Sinusknoten der Maus	55
Abb. 3.17	Immunhistochemische HCN4 Färbung im Sinusknoten der Maus	56
Abb. 3.18	HCN4 Protein in isolierten Sinusknotenzellen.....	57
Abb. 3.19	HCN4 im AV Knoten und in den Herzklappen.....	58
Abb. 3.20	LacZ Charakterisierung (GTEV49 Cre).....	60
Abb. 3.21	LacZ Analyse im Schnitt durch den Sinusknoten (GTEV49 Cre).....	61
Abb. 3.22	LacZ Charakterisierung (MHC-Cre)	61
Abb. 3.23	LacZ Charakterisierung (ROSA Cre)	62
Abb. 3.24	LacZ Charakterisierung (MCK Cre).....	63
Abb. 3.25	LacZ Charakterisierung (MerCreMer)	64
Abb. 3.26	Verwendete Genotypen	65
Abb. 3.27	Western Analyse (HCN4-MerCreMer-KO)	66
Abb. 3.28	Immunhistochemische Untersuchung des Sinusknotens (HCN4-MerCreMer-KO) ...	67
Tab. 2.1	Verwendete Restriktionsenzyme	10
Tab. 2.2	Gewebebehandlung für Paraffinschnitte	30
Tab. 3.1	Bestimmung des embryonalen Todeszeitpunktes HCN4-defizienter Tiere	40
Tab. 3.2	Übersicht der getesteten Cre Linien	60
Tab. 6.1	Verwendete Primer.....	77
Tab. 6.2	Primer für Genotypisierung.....	77
Tab. 6.3	Primer für Sequenzierung/ cDNA-Amplifikation	78
Tab. 6.4	Verwendete Antikörper	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ABC	Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase Komplex	EGFP	"enhanced green fluorescent protein"
AC	Adenylatzyklase	EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ACh	Acetylcholin	EH	Embryoherz
Ao	Aorta	EKG	Elektrokardiogram
AP	Aktionspotential	ER^{T2}-LBD	mutierte Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors
APS	Amoniumperoxodisulfat	ET	Embryonaler Tag
AV	atrioventrikular	g	Gramm
β₁-AR	adrenerger Rezeptor Typ β ₁	Gβγ	βγ Untereinheit des G-Proteins.
BCA	2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)	GTEV	Gene Trap Expression Vektor
bp	Basenpaare	Gα_i	inhibierende α-Untereinheit des G-Proteins
Br	Bronchus	Gα_s	stimulierende α-Untereinheit des G-Proteins
BSA	Rinderserumalbumin	h	Stunde
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase	HCN	"hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel"
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	HE	Hämatoxyllin / Eosin
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat	i.p.	intraperitoneal
cm	Zentimeter	I_{Ca,L}	L-Typ Calciumstrom
CMV	Cytomegalovirus	I_r	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
CNBD	Bindungstasche für zyklische Nukleotide	IgG	Immunglobulin G
CNG	"cyclic nucleotide gated"	I_h	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
CO₂	Kohlendioxid	I_{KACH}	Acetylcholin-aktivierter Kaliumstrom
cpm	"counts per minute"	I_Q	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
Cre	Cre Rekombinase	kb	Kilobase
CreER^{T2}	Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombinase mit ERT2-LBD	KBI	Kraftbrühe I
Cy2	Carbocyanin	kDa	Kilodalton
Cy3	Indocarbocyanin	KO	Knock-out
DAB	Diaminobenzidin	l	Liter
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	LA	linker Vorhof
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	LB	Luria-Bertani
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	LCCV	linke gemeinsame Kardinalvene
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	loxP	DNA-Substrat der Cre-Rekombinase („locus of crossing over of P1")
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LSM	Laser Scan Mikroskopie
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat		
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat		
DRG	"dorsal root ganglion"		
DTT	Dithiothreitol		
dTTP	Desoxythymidintriphosphat		
ECL	"enhanced chemiluminescence"		

M₂	muskarinischer Rezeptortyp2	RCCV	rechte gemeinsame Kardinalvene
mA	Milliamper	rpm	Umdrehungen pro Minute
MCK	Muskelkreatinkinase	RT	Raumtemperatur
MDP	maximal diastolische Potential	SA	Sinusknotenarterie
Mer	mutierter Östrogenrezeptor	SAN	Sinusknoten
mg	Milligramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
MHC	"myosin heavy chain"	sec	Sekunde
min	Minute	SF	Selektivitätsfilter
V	Volt	SVC	Vena cava superior
NE	Norepinephrin	TBE	Tris-Borat-EDTA
n	Nano	TBST	Tris-gepufferte Saline Tween
NGS	normales Ziegenserum	TE	Tris-EDTA
OD	optische Dichte	TEMED	N,N,N',N',Tetramethyl- ethylendiamin
OT	Objektträger	tg	Transgen
p.c.	post coitum	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- methylamin
pA	Pikoamper	TU	Technische Universität
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	ÜN	über Nacht
PBS	Phosphat-gepufferte Saline	UV	Ultraviolett
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion	V	Volt / Ventrikel
pF	Pikoferrat	WT	Wildtyp
PFA	Paraformaldehyd	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactopyranosid
pmol	Pikomol	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
PVDF	Polyvinylidendifluorid		
RA	rechter Vorhof		

1 Einleitung

1.1 I_h-Kanäle

I_h-Kanäle werden im Gegensatz zu den meisten anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen durch hyperpolarisierte Membranpotentiale aktiviert. Der von diesen Kanälen geleitete Strom wurde wegen seinen ungewöhnlichen und unerwarteten Eigenschaften mit I_f für "funny" (Brown et al, 1979) oder I_Q für "queer" (Halliwell et al, 1982) bezeichnet. Heute wird als Bezeichnung für den Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom weitgehend I_h verwendet (h für Hyperpolarisation). Diesem Strom werden verschiedenste physiologische Funktionen, wie kardiale und neuronale Schrittmacheraktivität, Kontrolle des Ruhemembranpotentials und neuronaler Plastizität zugeschrieben. Der wirkliche Beitrag des Stroms zu diesen physiologischen Funktionen ist aber weitgehend unklar. Vor allem die Rolle der I_h-Kanäle als maßgeblicher Schrittmacher im Sinusknoten wird seit Jahren kontrovers diskutiert.

1.1.1 Die HCN-Kanal Familie

Etwa 20 Jahre nach der ersten Charakterisierung des nativen I_h-Stroms (Noma & Irisawa, 1976; Fain et al, 1978; Brown et al, 1979) gelang es 1998 mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander verschiedene cDNAs, die für Schrittmacherkanäle kodieren, zu klonieren (Gaus et al, 1998; Ludwig et al, 1998; Santoro et al, 1998; Ludwig et al, 1999). Diese Kanäle wurden "*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channels*" (HCN) genannt.

Im Säugetier wurden bislang vier Mitglieder der HCN-Kanal Familie (HCN1 bis HCN4) identifiziert. Diese werden aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft in die Superfamilie der spannungsabhängigen Kationenkanäle eingegliedert. Die nächsten Verwandten sind die Kaliumkanäle der EAG-Familie und CNG-Kanäle. Die HCN-Kanäle besitzen 6 Transmembransegmente (S1-S6, Abb.1.1). Das S4 Segment trägt eine 10 x positive Ladung und dient als Spannungssensor. Die ionenleitende Pore liegt zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment. Im Carboxyterminus tragen die Proteine eine Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD, "*cyclic nucleotide binding domain*"). Diese zeigt eine signifikante Sequenzhomologie zu den CNBDs anderer zyklonukleotid-aktivierter Proteine, wie den cAMP und cGMP abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al, 1999), den cAMP-regulierten Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (de Rooij et al, 1998),

dem katabolen Genaktivator Protein CAP aus *E. coli* und den CNG-Kanälen (Biel et al, 1999). Dabei besteht die größte Übereinstimmung zur Zyklonukleotid-Bindungstasche von CNG-Kanälen.

Die vier HCN-Kanal Isoformen zeigen untereinander eine enge Verwandtschaft. Die Aminosäuresequenzen sind insgesamt zu etwa 60% homolog, dabei stellt sich die "Kernregion" (S1-S6 und CNBD) als besonders stark konserviert dar. Hier beträgt die Homologie etwa 80-90%. Im Gegensatz dazu variieren die Kanäle stark im N- und C-Terminus und besitzen dort nur eine geringe Homologie.

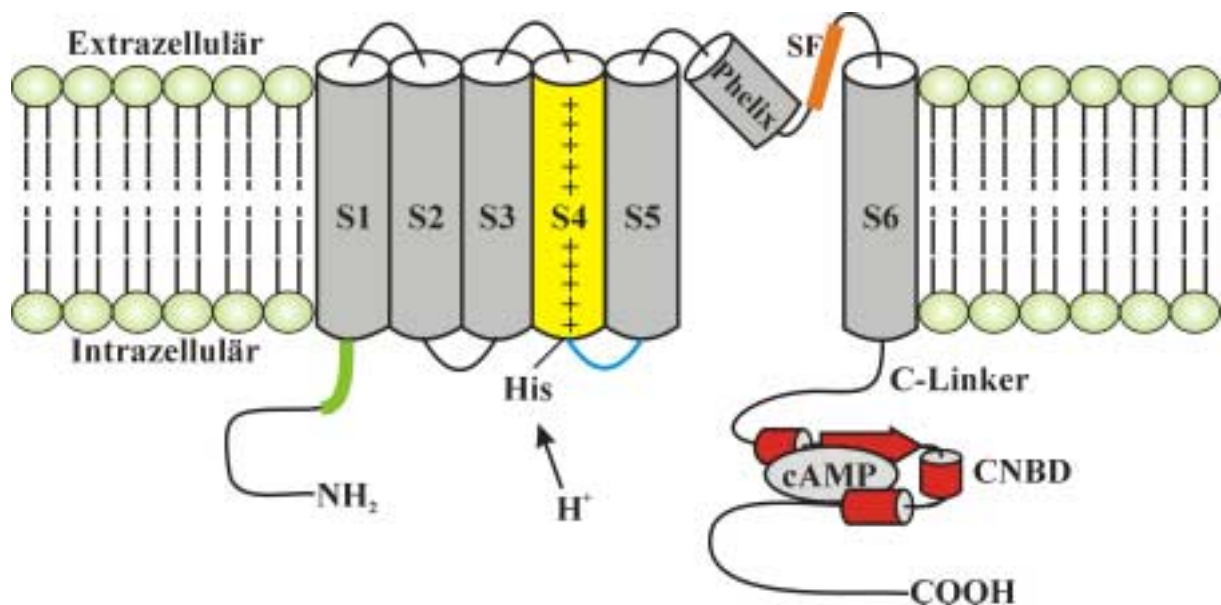


Abbildung 1.1: Schematisches Modell eines HCN-Kanals (modifiziert nach Biel et al, 2002)

Gezeigt sind die 6 Transmembrandomänen (S1-S6) und die ionenleitende Pore zwischen S5 und S6. Weiter ist der für die Modulation der Kanalaktivität wichtige C-terminus mit der C-Linker Region und der Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) dargestellt. Im N-terminus liegt ein 52 Aminosäuren langer konservierter intrazellulärer Bereich (grün) der für die Dimerisierung essentiell ist. Am intrazellulären Ende des Spannungssensor (S4) befindet sich der für die Aktivierung wichtige S4-S5 Linker (blau) und die protonierbare Aminosäure Histidin, welche für die pH Sensitivität verantwortlich ist. In Analogie zu KcsA Kanälen (Zhou et al, 2001) besitzt die Pore der HCN-Kanäle mit hoher Wahrscheinlichkeit einen helikalen Teil (P Helix) und einen Selektivitäts-Filter (SF, orange), der die Ionen-Permeation kontrolliert. cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

1.1.2 Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle

Im heterologen Expressionssystem (*HEK293* Zellen, *Xenopus* Oocyten) führt jede einzelne HCN cDNA zur Bildung eines Ionenkanals mit den typischen Eigenschaften nativer I_h -Kanäle, wie Aktivierung durch Membranhyperpolarisation, selektive Leitfähigkeit für Na^+ und K^+ Ionen, Modulation durch zyklische Nukleotide und Blockade durch extrazelluläres Cs^+ (Ludwig et al, 1998; Santoro et al, 1998; Ishii et al, 1999; Seifert et al, 1999; Moosmang et al, 2001).

1.1.2.1 Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung

Für die durch Hyperpolarisation verursachte HCN-Kanal Aktivierung sind zwei konkurrierende Modelle vorgeschlagen worden. Das erste Modell orientiert sich an Studien mit mutierten HERG-Kanälen (Trudeau et al, 1995; Smith et al, 1996). In diesem befindet sich der Kanal während des Ruhemembranpotentials im inaktiven Zustand und wird durch Hyperpolarisation in den aktiven Zustand versetzt ("*recovery of inactivation*").

Im zweiten Modell wird der Kanal durch Hyperpolarisation vom geschlossenen in den offenen Zustand überführt. Das S4-Segment (Spannungssensor) reagiert auf Potentialveränderungen. Hyperpolarisation wird mit einer Einwärtsbewegung und Depolarisation mit einer Auswärtsbewegung beantwortet (Manniko et al, 2002). Somit orientiert sich der Spannungssensor der HCN-Kanäle auf die gleiche Weise wie der von Ionenkanälen, die durch Depolarisation aktiviert werden. Da nun aber HCN-Kanäle, im Gegensatz zu Depolarisations-aktivierten Kanälen, durch Hyperpolarisation und nicht durch Depolarisation geöffnet werden, muss die Kopplung zwischen dem Spannungssensor und dem "*activation gate*" in diesen beiden Kanaltypen entgegengesetzt erfolgen. Mutationsstudien unterstützen dieses Modell und zeigen einen wichtigen Einfluss des S4-S5 Linkers auf diesen Kopplungsprozess in HCN-Kanälen (Chen et al, 2001).

Die Aktivierung der nativen und klonierten I_h -Kanäle zeigt eine sigmoidale Zeitabhängigkeit. Die verschiedenen HCN-Isoformen können eindeutig durch ihre Aktivierungsgeschwindigkeit unterschieden werden. HCN1 besitzt die schnellste Aktivierungskinetik (Zeitkonstante τ : 25 bis 300 ms) gefolgt von HCN2 und HCN3 (τ : 180 bis 500 ms). HCN4 zeigt mit einer Zeitkonstante τ von 300 ms bis einigen Sekunden die mit Abstand langsamste Aktivierungskinetik. Die Öffnungsgeschwindigkeit ist stark von den experimentellen Bedingungen abhängig. Das Membranpotential, pH und Temperatur beeinflussen die Kinetik und erschweren so die Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Arbeitsgruppen.

1.1.2.2 Ionenleitfähigkeit

In der Porenregion weisen die HCN-Kanäle eine enge Verwandtschaft zu Kaliumkanälen auf. Sie besitzen die für Kaliumkanäle typische Aminosäuresequenz ("*signature sequence*") GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin), den Hauptbestandteil des Kalium Selektivitätsfilter (Doyle et al, 1998). Trotz dieser engen Verwandtschaft zeigen die Schrittmacherkanäle eine relativ geringe Selektivität für Kalium ($P_{Na}/P_K = 0,15$ bis $0,25$) und erzeugen unter physiologischen

Bedingungen einen depolarisierenden Na^+ Einwärtsstrom. Warum in den HCN-Kanälen eine geringere Kaliumselektivität als in den Kaliumkanälen vorliegt, ist noch nicht geklärt. Anscheinend spielen noch andere Aminosäuren außerhalb des GYG-Motivs für die Selektivität eine wichtige Rolle.

1.1.2.3 Modulation durch zyklische Nukleotide

Die HCN-Kanäle können direkt durch zyklische Nukleotide, insbesondere cAMP, stimuliert werden. Bindet cAMP an die CNBD des Schrittmacherkanals so verschiebt sich die Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen hin, zusätzlich wird die Öffnungsgeschwindigkeit des Kanals erhöht. Im Bezug auf die cAMP Modulation unterscheiden sich die HCN-Kanäle untereinander. Während das Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{0,5}$ von HCN2 und HCN4 durch cAMP erheblich zu positiveren Potentialen hin verschoben wird (etwa +15 mV; Ludwig et al, 1999), zeigt HCN1 nur eine geringe cAMP Antwort (± 0 bis +7mV; Moroni et al, 2001; Ulens & Tytgat, 2001).

Untersuchungen an trunkierten HCN-Kanälen (Wainger et al, 2001; Wang et al, 2001) führten zu einem Modell für die cAMP Stimulation. Hierbei interagiert die nicht cAMP besetzte CNBD mit der Kernregion des HCN-Kanals, inhibiert damit dessen Öffnung und verursacht eine Verschiebung der Aktivierung zu negativeren Potentialen hin. Die cAMP Bindung an die CNBD hebt diese Hemmung auf. Anhand dieses Modells werden Unterschiede in der cAMP Antwort zwischen HCN1 und HCN2 bzw. HCN4 durch unterschiedlich stark ausgeprägte basale CNBD Inhibierungen erklärt. So wird HCN1 nur schwach von der CNBD inhibiert und daher nur gering durch cAMP aktiviert. Im Gegensatz dazu reagieren HCN2 und HCN4 stärker auf zyklische Nukleotide, da diese Isoformen in stärkeren Ausmaß durch die nicht besetzte CNBD inhibiert werden.

1.1.2.4 Modulation durch pH

Neben der Aktivierung durch zyklische Nukleotide können HCN-Kanäle auch durch den intrazellulären pH moduliert werden (Munsch&Pape, 1999). Ein niedriger pH verlangsamt die Öffnungsgeschwindigkeit und verschiebt die Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen. Hauptsächlich verantwortlich für die pH Sensitivität ist ein konserviertes Histidin am intrazellulären Ende des Spannungssensors (His 321 im HCN2, Zong et al, 2001). Diese Art

der Modulation könnte bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sein, wie z.B. an thalamischen Oszillationen oder an der Regulation der Atemfrequenz.

Im Gegensatz zu den intrazellulären Effekten bewirkt ein stark saurer extrazellulärer pH-Wert ($\text{pH} < 5,0$) eine Aktivierung des Kanals ($V_{0,5}$: +30 mV). In der Ratte konnte gezeigt werden, dass dieser Protonen abhängige Mechanismus in spezialisierten Geschmackszellen den sauren Geschmack vermittelt (Stevens et al, 2001).

1.1.2.5 Homomer-/Heteromer- Bildung

Da in manchen Zelltypen verschiedene HCN-Isoformen expremiert werden (z.B. HCN2+4 in Sinusknotenzellen, HCN1+2 in CA1 Pyramiden Neuronen) wurde die Frage aufgeworfen, ob verschiedene Untereinheiten in der Lage sind miteinander heteromere Kanäle zu bilden.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten diese Möglichkeit für die Isoformen HCN1 und HCN2. Die Expression eines HCN1-HCN2 Tandem Dimer (Ulens et al, 2001) und die Coexpression der einzelnen Untereinheiten (HCN1, HCN2; Chen et al, 2001) in *Xenopus* Oozyten führte zu I_h -Strömen mit neuartigen Eigenschaften, die zwischen denen von HCN1 und HCN2 Homomeren lagen. Eine andere Arbeitsgruppe (Xue et al, 2002) zeigte, dass eine dominant negative HCN1 Porenmutante sowohl die Expression von HCN1 als auch von HCN2 Wildtyp Kanälen unterdrückt. Außerdem konnte durch die Art der dosisabhängigen Unterdrückung auf eine Tetramerbildung der HCN-Kanäle geschlossen werden. Biochemische Daten sprechen dafür, dass eine konservierte N-terminal liegende Domäne für die Interaktion zwischen den Kanalproteinen von Bedeutung ist (Proenza et al, 2002; Tran et al, 2002). Inzwischen konnte auch die Heteromerbildung zwischen den anderen HCN-Isoformen in HEK293 Zellen (bis auf HCN2 mit HCN3) gezeigt werden (Much et al, 2003). Offen bleibt allerdings die Frage, ob nur in überexpmierenden heterologen Systemen oder auch *in-vivo* eine Heteromerbildung tatsächlich stattfindet.

Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass HCN-Kanäle durch die Interaktion mit einer Hilfsuntereinheit modifizierte I_h -Ströme entwickeln können. Wird das *min-K related peptide* (MiRP1 oder KCNE2) zusammen mit HCN1 oder HCN2 in Oozyten coexpremiert, erhöht dies die I_h -Stromdichte und beschleunigt die Öffnungsgeschwindigkeit (Yu et al, 2001).

1.2 Die Rolle von I_h im kardialen Reizleitungssystem

1.2.1 Ist I_h an der Schrittmacheraktivität im Sinusknoten beteiligt?

Mit den frühen Studien am Sinusknoten des Kaninchens von Brown & DiFrancesco (1980) und Yanagihara & Irisawa (1980) wurden nicht nur die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften des I_h -Stroms definiert; es war auch der Anfang einer bis heute andauernden kontroversen Diskussion über den Beitrag von I_h zur kardialen Rhythmusbildung.

Yanagihara und Irisawa begriffen I_h als einen depolarisierenden Hintergrund-Einwärtsstrom, der im Sinusknoten lediglich dem hyperpolarisierenden Einfluss des umgebenden atrialen Myokards entgegenwirkt, um das relativ positive MDP (maximal diastolische Potential) im primären Schrittmacherzentrum aufrechtzuhalten. Im Gegensatz dazu führten Brown und DiFrancesco experimentelle Belege auf, die einen wichtigen, direkten Beitrag des Stroms zur Rhythmusbildung nahe legten. Laut diesen Autoren wird I_h während der Diastole im Sinusknoten aktiviert und leistet einen direkten Beitrag zur langsamen diastolischen Depolarisation. Zum anderen stimuliert Norepinephrin Herzfrequenz und I_h -Strom (DiFrancesco, 1993; Brown et al, 1979). Darauf folgende Studien mit I_h -Blockern (Thollon et al, 1994; Simon et al, 1995; Leitch et al, 1995; Kobinger et al, 1984) lieferten weitere Hinweise für einen direkten Beitrag von I_h -Kanälen während der Generierung eines Sinusknotenaktionspotentials. Unter dem Einfluss der Blocker trat eine signifikante Verlangsamung der Herzfrequenz auf.

Allerdings wird von verschiedenen Autoren die Rolle von I_h als Schrittmacher im Herzen aus mehreren Gründen, z.B. wegen der unterschiedlichen Aktivierungspotentiale des Stroms, in Frage gestellt (Noma et al, 1983; Irisawa et al, 1993; Vasalle et al, 1995). Die Rolle von I_h in der kardialen Erregungsbildung ist daher unklar.

1.2.2 Ist I_h an der Modulation der Herzfrequenz beteiligt?

Abgesehen von einem möglichen direkten Beitrag zur Rhythmusgenerierung wurden dem I_h -Strom noch weitere Aufgaben im kardialen Reizleitungssystem zugesprochen. Vor allem während der Herzfrequenzmodulation durch das autonome Nervensystem scheint der I_h -Strom möglicherweise eine wichtige Rolle zu spielen. So bewirkt eine Sympathikusstimulation via β_1 -Adrenorezeptoren eine Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels und damit eine verstärkte direkte Aktivierung der I_h -Kanäle (DiFrancesco & Tortora

1991). Dies führt zu einem verstärkten Einwärtsstrom, was wiederum zu einer beschleunigten Phase 4 Depolarisation und somit zu einer Zunahme der Herzfrequenz führen könnte (Brown et al, 1979). Neben den I_h -Kanälen besitzen die L-Typ Calciumkanäle eine vergleichbare Sensitivität gegenüber β -adrenerger Stimulation. Aufgrund der Strom-Spannungs-Beziehung soll sich ein aktivierter $I_{Ca,L}$ Strom aber eher auf die späte Phase der diastolischen Depolarisation und nicht auf die durch β -Sympathomimetika modulierte frühe Phase des Schrittmacherpotentials auswirken (Zaza et al, 1996). Auch an parasympathischen Vorgängen scheint I_h beteiligt zu sein. Gegenüber Acetylcholin (ACh) zeigt I_h eine höhere Sensitivität als $I_{K_{ACh}}$ (ACh aktivierter Kaliumstrom) oder $I_{Ca,L}$. So führt eine durch ACh verursachte Abnahme der intrazellulären cAMP Konzentration zu einer Verminderung des I_h -Stroms und so damit möglicherweise zu einer Abnahme der Herzfrequenz (DiFrancesco et al, 1989). Ein mögliches Modell für die Frequenzmodulation ist in Abb. 1.2 gezeigt.

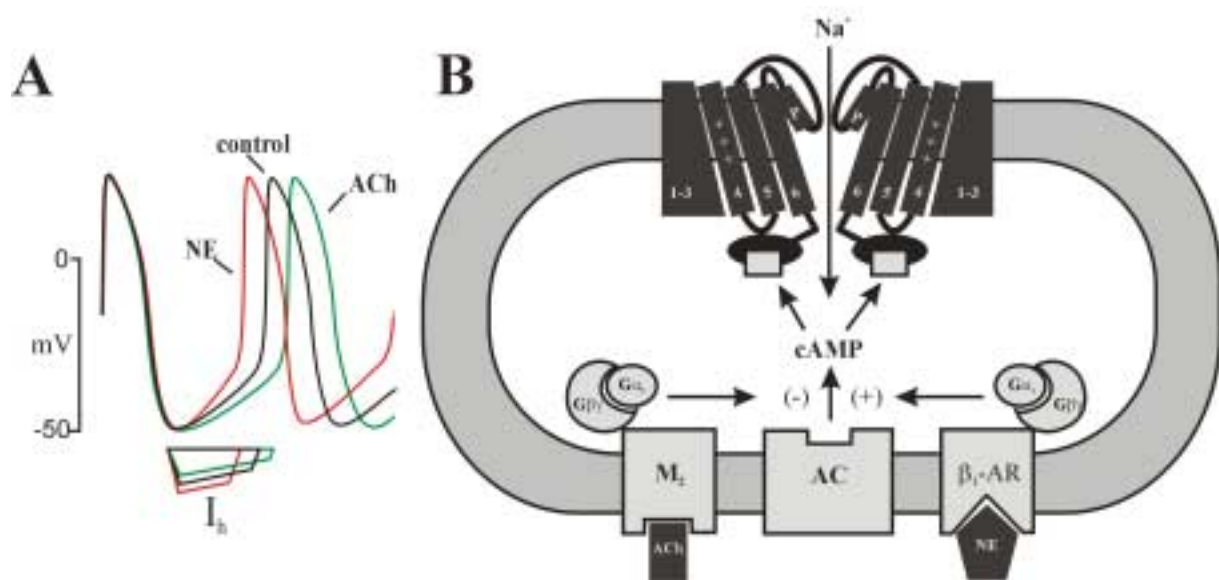


Abbildung 1.2: Modell für die Modulation des Schrittmacherpotentials

(A) Schrittmacherpotential im Sinusknoten unter Kontrollbedingungen (schwarz), nach β -adrenerger Stimulation durch Norepinephrin (NE, rot) und nach Stimulation durch Acetylcholin (ACh, grün). (B) Schematische Darstellung einer Sinusknotenzelle veranschaulicht die Modulation des HCN-Kanals durch Erhöhung und Erniedrigung des cAMP Spiegels. M_2 : muskarinischer Rezeptor Typ 2; AC: Adenylatcyclase; β_1 -AR: adrenerger Rezeptor Typ β_1 ; G_{α_i} : α -Untereinheit des G-Proteins (inhibiert AC); G_{α_s} : α -Untereinheit des G-Proteins (stimuliert AC); $G\beta\gamma$: $\beta\gamma$ Untereinheit des G-Proteins. (Abb. B modifiziert nach Biel et al, 2002)

1.2.3 Besitzt I_h einen stabilisierenden Einfluss auf die Zykluslänge?

Die Tatsache, dass der I_h -Strom auf Hyperpolarisation hin einen depolarisierenden Einwärtsstrom generiert, lässt einen stabilisierenden Effekt gegenüber hyperpolarisierenden Einflüssen auf Schrittmacherpotential und Zykluslänge vermuten. So könnte der I_h -Strom zu

einem stabileren Herzrhythmus beitragen. Wird HCN2 in neonatalen ventrikulären Myocyten überexprimiert, so beschleunigt sich nicht nur die spontane Schlagfrequenz, es vermindert sich auch die Variabilität zwischen den Schlägen signifikant (Qu et al, 2001).

1.3 HCN-Expression im Herzen

HCN1, HCN2 und HCN4 Transkripte werden im adulten Herzen exprimiert. Das Expressionsmuster der einzelnen Isoformen variiert dabei in verschiedenen kardialen Regionen und in verschiedenen Spezies. Im Sinusknoten findet sich in allen bis jetzt untersuchten Spezies vorwiegend HCN4 mRNA. Über 80% des gesamten HCN Transkripts wird durch diese Isoform repräsentiert (Shi et al, 1999; Moosmang et al, 2001). Zusätzlich wird HCN1 signifikant im Kaninchensinusknoten exprimiert (20% der gesamte HCN mRNA; Shi et al, 1999). Hingegen konnte HCN1 Transkript nur minimal im murinen Sinusknoten nachgewiesen werden, dort wird neben HCN4 vor allem HCN2 exprimiert (Moosmang et al, 2001).

Auch in Purkinje Fasern konnten HCN-Kanäle detektiert werden. Dabei wird in den spontan aktiven Purkinje Zellen des Hundes, die einen großen I_h zeigen, überwiegend HCN4 mRNA (90% der gesamte HCN mRNA) und etwas HCN2 exprimiert (Han et al, 2002). Dagegen konnte in den Purkinje Zellen des Kaninchens, die nur eine geringe spontane Aktivität besitzen auch nur geringe HCN Transkriptmengen nachgewiesen werden (Shi et al, 1999).

In den Zellen des Arbeitsmyokards finden sich nur niedrige HCN mRNA Mengen. Im Kaninchenventrikel konnte nur HCN2 detektiert werden (Shi et al, 1999). Im Hund und in der Ratte konnten dagegen auch noch geringe Mengen an HCN4 Transkript detektiert werden (Shi et al, 1999, 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es durch Einsatz einer konventionellen sowie auch einer konditionalen Knock-out Strategie die physiologische Funktion von HCN4 zu analysieren. Insbesondere sollte der Beitrag während der kardialen Rhythmusbildung und damit auch die stark diskutierte Rolle der I_h -Kanäle während der Schrittmacherdepolarisation aufgeklärt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt bestand darin, das HCN4 Protein Expressionsmuster im kardialen Reizleitungssystem aufzuzeigen. Dabei standen immunhistochemische Untersuchungen des murinen Sinus- und AV-Knotens im Vordergrund.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien und Plasmide

2.1.1 Verwendeter Stamm

Plasmide wurden im *Escherichia Coli* Stamm XL-1-blue MRF' (Stratagene) amplifiziert. Der Genotyp dieses Stamms lautet $\Delta(mrcA)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' *proAB lacI^q ZΔM15 Tn10* (Tet^r)].

2.1.2 Verwendetes Plasmid

Zur Herstellung von cRNA Gensonden für die *in-situ* Hybridisierung wurde das Plasmid pAL1 verwendet. Dieser Vektor wurde aus pUC19 konstruiert, indem zu beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für den T3- bzw. T7-RNA-Polymerase-Promotor und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und Asp718 eingefügt wurden (Ludwig et al. 1997).

2.2 Anzucht und Stammhaltung

2.2.1 Nährmedium und Antibiotikum

Die Züchtung von Bakterien (*E. coli*) erfolgte im Vollmedium Luria-Bertani (LB). Das Medium wurde vor Verwendung durch Autoklavieren bei 121°C, 2 bar, 20 min sterilisiert.

Luria – Bertani – Medium

Pepton (Gibco-BRL)	10 g
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,2 - 7,5	

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB-Medium kurz vor der Anzucht das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die wässrige Stammlösung mit 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) in H₂O wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei – 20°C aufbewahrt. Für Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Gibco-BRL) hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von Bakterien (*E. coli*) erfolgte in LB-Medium. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmayerkolben angezogen und bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert. Zur längeren Konservierung wurden Flüssigkulturen angezogen, 1: 1 mit 100% Glycerin (ICN) vermischt und in Gefrier Röhrchen bei –80°C gelagert. Die Zugabe von Glycerin bewirkt, dass die Zellen unempfindlicher gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen sind.

2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen (auch kurz Restriktionsenzyme genannt) bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Basensequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten (Sambrook et al, 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNA-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierten Enden entstehen. Bei der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung entstehen einander komplementäre, 5'- bzw. 3'- überhängende Enden („sticky ends“), die immer eine 5'Phosphat- und eine 3'Hydroxyl-Gruppe besitzen, was die enzymatische Neuverknüpfung kompatibler Enden ermöglicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2-1 angegeben. Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen wurden den entsprechenden Produktbeschreibungen der Hersteller entnommen.

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
Asp718	Roche	5'-G/GTACC-3'	B
Bam HI	NEB	5'-G/GATCC-3'	B
EcoRI	NEB	5'-G/AATTC-3'	NEB3
HindIII	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB2

Tabelle 2.1 Verwendete Restriktionsenzyme; Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet

2.3.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Analyse von isolierter und klonierter DNA eingesetzt. Dazu wurden ca. 100 ng DNA in 15 µl Reaktionsansatz 1 h geschnitten. Für präparative

Ansätze zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden 2-4 µg DNA in 40 µl Gesamtvolumen geschnitten. Pro µg DNA und pro h wurden 5-10 Units Enzym eingesetzt. Die Enzymmenge sollte nicht mehr als 1/10 des Ansatzes betragen. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert.

2.4 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Plasmid und DNA-Fragmente wurden durch Ethanol-Präzipitation konzentriert und von störenden Substanzen getrennt (Sambrook et al. 1989). Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und dem 2,5 fachen Volumen 100% Ethanol versetzt und 1h bei -80°C inkubiert, die ausgefällte DNA abzentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation (12000 x g, 5 min, 4°C) in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in einer geringen Menge sterilen Wassers aufgenommen.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0:

- 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
- 40 µg/ml einzelsträngiger RNA
- 33 µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNA und RNA kann aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ abgeschätzt werden. Dieser Quotient soll über 1,7 liegen.

2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine (z.B. Enzyme) aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Die Nukleinsäurelösung wurde mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25: 24: 1, Roth) versetzt, bis zur Emulsionsbildung kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung abzentrifugiert (12 000 x g, 5 min). Die wässrige Phase, in der die Nukleinsäuren enthalten sind, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al, 1988) ist eine enzymatische Methode zur *in-vitro* Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die Primer binden spezifisch an den kodierenden bzw. an den nicht-kodierenden Strang eines DNA-Stückes. Die DNA-Matrize wird durch Hitzedenaturierung (94°C) zunächst in Einzelstränge aufgeschmolzen. Danach können die Primer, die in großem molarem Überschuss vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Primer-Annealing). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation). Nach wiederholten Aufschmelzen und Annealing synthetisiert die DNA-Polymerase erneut. Im Idealfall wird in jedem Zyklus der DNA Abschnitt verdoppelt, der durch die Oligonukleotide flankiert wird. Damit kommt es zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zu folgenden Zwecken verwendet:

- zur Amplifikation von genomischen DNA-Fragmenten aus Mausgewebe (Genotypisierung)
- zur Expressionsanalyse auf RNA-Ebene. Hierfür wurde vorab die RNA enzymatisch durch eine Reverse Transkriptase (RT) in eine cDNA umgeschrieben, die dann durch PCR amplifiziert wurde,

2.5.1 PCR-Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Sequenzen sind im Anhang (5.1) wiedergegeben. Die lyophilisierte Primer-DNA wurde in soviel H₂O_{dest.} gelöst, dass die Konzentration 100 pmol/μl betrug. Davon wurden Arbeitslösungen von 10 pmol/μl hergestellt.

2.5.2. Standardprotokoll

Die thermostabile *Taq* DNA-Polymerase und der 10x PCR-Puffer wurden von der Firma Promega bezogen. Die Arbeitslösung der dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP [NEB]) wurde auf 1,25 pmol/μl eingestellt.

Reaktionsansatz für die Genotypisierung:

DNA (ca. 500 ng genomische DNA)		2,0 µl
Primer A	(10 pmol/µl)	1,25 µl
Primer B	(10 pmol/µl)	1,25 µl
Primer C*	(10 pmol/µl)	1,25 µl
Primer D*	(10 pmol/µl)	1,25 µl
10x PCR-Puffer		2,5 µl
dNTPs	(1,25pmol/µl)	4,0 µl
Taq-DNA-Polymerase	(5 U/µl)	0,3 µl
H ₂ O		ad 25µl
*fallweise		

Standardbedingungen für die Amplifikation:

(DNA Fragmente bis ca. 1 kb)

initiale Denaturierung	94°C, 5 min	
Denaturierung	94°C, 10 sec	} 35x
Annealing	55°C, 30 sec	
Elongation	72°C, 30 sec	
finale Elongation	72°C, 5 min	

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente (Elongationszeit und –temperatur) und Primersequenzen (Annealingtemperatur) optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden im UNO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNA-Standard (1 kb-Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert mit DNA-Fragmenten von ca. 100 bp und markiert die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNA-Fragmenten von etwa 5 kb.

10x TBE

0,9 M Tris (USB)
 0,9 M Borsäure (Merck)
 20 mM EDTA (ICN)

Auftragspuffer (6x dye)

18% Ficoll Typ 400 (Sigma)
 0,12 mM EDTA, pH 8,0
 6x TBE
 0,1% Bromphenolblau (Serva)
 0,1% Xylencyanol FF (Sigma)

Elektrophoresepuffer

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H₂O_{dest.})

Ethidiumbromidstammlösung

10 mg/ml (Sigma), wässrig

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Längenbereich von 0,2 bis 12 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrock et al, 1998) verwendet. Für analytische und präparative Zwecke wurden 0,6-2 % (g/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen; vor dem Ausgießen der etwas abgekühlten Agaroselösung in eine horizontale Kammer wurde Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 300 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Laufpuffer über 1 h bei 150 - 200 V.

2.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNA – Fragmente mit einer Länge von 50 – 1000 bp wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden 5%ige Polyacrylamidgele in 1 x TBE als Laufpuffer (Sambrock et al, 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm (analytische Gele) bzw. 1,5 mm (präparative Gele).

Analytisches Polyacrylamidgel:

Rotiporesegel (Verhältnis Acrylamid / NN'-Bisacrylamid = 29 : 1, 40%, Roth)	3,8 ml
10 x TBE	3 ml
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin, Sigma)	0,1%
20% APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)	80 µl
H ₂ O	ad 30 ml

Für **präparative Polyacrylamidgele** wurden die doppelten Mengen eingesetzt.

Den DNA-Proben wurde vor Auftragen 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer zugegeben. Damit die Proben langsam einlaufen können, wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die Elektrophorese erfolgte schließlich bei 270 V für 1 h. Als Längenstandard wurden 700 ng der 1 kb Ladder (Gibco-BRL) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

2.6.3 Elektroelution

Um ein DNA-Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch isolieren zu können, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde mit 1x TBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) überführt und die DNA in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 140 mA auf Eis aus dem Gel eluiert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNA durch Ethanolfällung (2.5.1) isoliert.

2.7 Sequenzreaktion

Die Sequenzanalyse der DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al, 1977). Die enzymatische Synthese der unterschiedlich langen, markierten DNA-Fragmente wurde mittels "Terminator Cycle Sequencing" durchgeführt. Durch Verwendung eines spezifischen Primers synthetisiert eine thermostabile, exonucleasefreie DNA-Polymerase einen komplementären Strang des gewünschten DNA-Fragments. Der Reaktion sind neben der zu sequenzierenden DNA, dem Primer und der DNA-Polymerase noch Desoxynukleotide (dNTP) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) zugesetzt. Nach Einbau eines ddNTPs ist eine Verlängerung der DNA nicht mehr möglich und es kommt zum Kettenabbruch. Bei korrekter Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Da jede der vier Basen durch einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann die Basenfolge nach Auftrennung der Fragmente ermittelt werden. Die Auftrennung erfolgte automatisch durch Kapillarelektrophorese ("ABI PrismTM Sequence-Analyser", Perkin-Elmer Applied Biosystems). Die markierten Didesoxynukleotide werden dabei mit einem Laser angeregt, das emittierte Licht der vier verschiedenen Wellenlängen (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm) wird detektiert. Aus den Rohdaten wird von einem Computerprogramm die DNA-Sequenz errechnet.

Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

Ansatz:	DNA (50-500 ng)	x µl
	Ready Reaction Mix* (RRM)	4 µl
	Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
	H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl
	*enthält AmpliTaq DNA Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenz-markierte ddNTPs (Perkin-Elmer Applied Biosystems)	

Synthese der DNA-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C	2 min	} 25x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	50°C	40 sec	
Polymerisation	60°C	4 min	

Die Reinigung des Sequenzierproduktes erfolgte mit „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers. Die getrocknete DNA wurde in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

2.8 Isolierung von DNA

2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausgewebe zur Genotypisierung

Das Mausgewebe (Teil des Mausschwanzes oder Dottersack des Embryos) wurde über Nacht bei 55°C in 100 µl Lysepuffer verdaut. Am nächsten Tag wurde das Lysat bei 95°C für 15 min gekocht. Durch die Hitzebehandlung wird die Proteinase K inaktiviert. Anschließend wurde die Lösung 5 min zentrifugiert (12000 rpm), der Überstand abgehoben und bei 4°C kurzfristig oder bei -20°C langfristig gelagert.

Lysepuffer:	Proteinase K (20 mg/ml)	2 µl
	10x PCR Puffer (Promega)	10 µl
	H ₂ O	ad 100 µl

2.8.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Mausgewebe zur Southern

Hybridisierung

Um hochreine genomische DNA aus embryonalem Mausgewebe zu isolieren, wurde der „Qiagen Genomic DNA Kit“ zur Hilfe genommen. 1 bis 2 komplette Embryonen (insgesamt ca. 30 mg) wurden in tiefgefrorenem Zustand in einem Lysepuffer, der u. a. Guanidiniumhydrochlorid, RNase A und Detergenzien enthielt, mittels Ultraturax homogenisiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) wurde das Homogenisat bei 50 °C inkubiert. Dabei wurden Zellen und Kerne lysiert, Proteine (wie Nukleasen und Histone) denaturiert und abgebaut. Nach etwa zwei Stunden war der Verdau abgeschlossen und die chromosomale DNA in genügendem Maße von gebundenen Proteinen befreit. Das Lysat wurde kurz gemischt und auf eine äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Qiagen genomic tip 100/G) aufgebracht. Zwei Waschschriffe entfernten unerwünschte

Verunreinigungen. Die DNA wurde mit auf 50 °C vorgewärmtem Puffer eluiert, mit Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (8000 rpm, 15 min, 4 °C, Rotor JS-13). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl H₂O_{dest.} resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die Ausbeute betrug ca. 0,5 µg/µl.

2.8.3 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnbaum und Doly, 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung. Eine Vorkultur wird morgens in 7 ml LB-Medium (2.2.1), das 50 µg/ ml Ampicillin (Sigma) enthält, gestartet. Nachmittags werden 200 ml Hauptkultur (LB-Medium mit Ampicillin [50µg/ml]) mit ungefähr 1 % der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wird ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienkultur wird durch Abzentrifugieren (10 min; 5000 rpm, 4°C) geerntet, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNA-Moleküle denaturieren. RNase A verdaut die freigesetzten RNA Moleküle. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relative kleine Plasmid-DNA wieder und bleibt deshalb in Lösung, während das viel größere weiterhin denaturierte Bakterienchromosom mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS abgetrennt werden kann. Nach der so durchgeführten alkalischen Lyse der Bakterien wird die negativ geladene DNA in einem Nidrigsalzpuffer an ein Anionenaustauscherharz gebunden, wobei Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen durch höhere Salzkonzentrationen gewaschen werden. Die DNA kann schließlich mit einem Hochsalzpuffer eluiert werden. Anschließend wird die DNA-Lösung durch eine Isopropanol-Fällung entsalzt, mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl H₂O aufgenommen.

2.9 Herstellung ³²P markierter DNA Sonden

Um ³²P-markierte DNA-Sonden zu erhalten, wurde das „Random primed Labeling“ Verfahren verwendet. Das als Matrize eingesetzte DNA-Fragment war durch Restriktionsenzyme aus Plasmid DNA geschnitten worden. Ein Gemisch aus Zufalls-Hexanukleotiden wurde als „random“-Primer genutzt (Feinberg & Vogelstein 1983), die an die Matrizen-DNA banden. An deren 3'-Ende begann die Synthese des komplementären Stranges durch das Klenow-Enzym. ³²P-markiertes dCTP wurde in den Strang eingebaut. Nach Abschluß der Reaktion wurde überschüssiges, nicht eingebautes ³²P-dCTP durch Säulenchromatographie über eine

NickTM Column (Pharmacia) entfernt werden. Die gereinigte Probe wurde mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

TE-Puffer

1 M Tris pH 8,0	10 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml
H ₂ O	1000 ml

2.10 Southern Hybridisierung

Der Name dieser Methode leitet sich von seinem Erfinder Edwin Southern ab (Southern 1975). Hierbei werden DNA-Fragmente, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine geeignete Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Bei dem Transfer der Nukleinsäuren von dem Gel auf die Membran bleibt das Trennmuster der Banden erhalten, d. h., die Membran ist eine Kopie des ursprünglichen Gels. Dieser Southern-Blot wird mit einer ³²P-markierten Probe hybridisiert. Durch anschließende Autoradiographie können die Banden, die komplementär zur radioaktiven Probe waren, detektiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Southern Analysen durchgeführt um den HCN4 KO auf genomischer Ebene zu bestätigen.

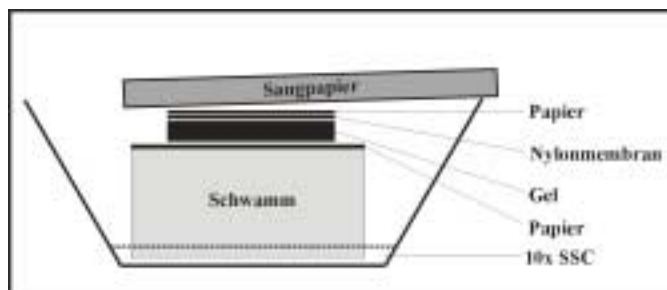


Abbildung 2.1: Aufbau eines Southern-Blots

Nach Elektrophorese der mittels Restriktionsenzymen gespaltenen DNA wurde das Agarosegel (2.7.1) in 0,2 N Salzsäure geschwenkt. Dieser Schritt führte zur partiellen Depurinierung der DNA Fragmente, wodurch Strangbrüche entstanden. Diese Längenreduktion verbesserte den Transfer von langen Molekülen. Anschließend wurde das Gel für 30 min in 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Nach einem Neutralisationsschritt in 0,5 M Tris (pH 7,5), 3 M NaCl konnte mit dem Blottingverfahren begonnen werden. Hierbei wurde das Gel auf einen mit 10x SSC getränkten, Schwamm gelegt und mit zugeschnittener Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham) bedeckt (siehe Abb. 2.1). Ein Stapel mit Saugpapier sorgte für die Kapillarkräfte, die den SSC-Puffer durch das Gel nach oben saugten. Dabei wanderten die Nukleinsäure-

Moleküle mit und blieben in der Nylonmembran hängen. Der Transferprozess wurde nach 15 - 18 Stunden abgebrochen, der Filter mit UV-Licht bestrahlt und bei 80 °C für 2 Stunden gebacken. Nach dieser Behandlung war die DNA kovalent an die Aminogruppen des Nylonfilters gebunden.

2.10.1 Hybridisierung

Die Membran mit der immobilisierten DNA wurde mitsamt 1 ml Churchpuffer pro 5 cm² Membran in einem Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für 3 h bei 60 °C präinkubiert. Hybridisiert wurde ebenfalls bei 60°C über Nacht in frischem Churchpuffer, dem die ³²P-markierte Gensonde mit einer Aktivität von 5x10⁶ cpm/ml hinzugefügt wurde. Am folgenden Tag wurde unspezifisch gebundene und überschüssige Gensonde in folgenden Waschschritten von der Membran entfernt:

- 15 min in 2x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 60°C,
- 30 min in 0,4x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 65°C,
- 30 min in 0,4x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 67°C,
- 30 min in 0,4x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 72°C.

Auf die Membran wurde ungefähr 4 h lang eine Phosphor Imager Platte aufgelegt, die anschließend an einem entsprechenden Gerät (FUJIFILM, BAS-1500) eingescannt und mit geeigneter Software (BAS Reader, TINA) bearbeitet wurde. Die DNA-Fragmente, die mit der Gensonde hybridisiert hatten, konnten anhand der Schwärzung auf dem eingescannten Bild identifiziert werden.

Churchpuffer:

NaPhosphat-Puffer, pH 7,4	0,5 M
BSA (Sigma)	1 %
SDS	7 %
EDTA pH 8,0	1 mM
ssDNA (Sigma)	0,1 mg/ml
(= Lachssperm-DNS)	

10% SDS

Natriumdodecylsulfat	50 g
H ₂ O	ad 500 ml

NaPhosphat-Puffer, pH 7,4

1 M Na ₂ HPO ₄	387 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	113 ml

20x SSC, pH~7,0

NaCl	175,3 g
Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O	88,2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.11 Isolierung und Analyse von RNA

Bei Arbeiten mit RNA ist darauf zu achten, dass eine Kontamination der RNA-haltigen Lösung mit Ribonukleasen ausgeschlossen wird oder die Aktivität der anwesenden RNasen minimiert wird. RNasen sind sehr stabile Proteine, die selbst Abkochen unbeschadet überstehen. Sie werden aber in Anwesenheit von z.B. Guanidiniumisothiocyanat und reduzierenden Agentien wie β -Mercaptoethanol inaktiviert (Chirgwin et al. 1979). Alle verwendeten Glaswaren, Pinzetten, Magnetührstäbchen, etc. wurden zur RNase-Dekontamination für 5 h bei 250 °C gebacken.

2.11.1 Isolierung von Gesamt- RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben wurde das TRIZOL[®]LS Reagenz von Gibco-BRL verwendet. Das frisch präparierte oder bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde zunächst in Guanidiniumisothiocyanathaltiger Lösung homogenisiert. Nach Durchmischung mit Phenol und Chloroform wurde durch Zentrifugation eine Phasentrennung erzielt. Die ausschließlich in der wässrigen Phase verbleibende RNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug in etwa 0,5 bis 1,0 μ g Gesamt-RNA pro 1 mg Gewebe. Die auf diese Weise gewonnene Gesamt- RNA wurde zur Herstellung von cDNA verwendet.

2.11.2 Synthese von einzelsträngiger cDNA

Um aus Boten-RNA komplementäre DNA zu erhalten, wurde die Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco-BRL) verwendet. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Nach Zugabe von oligo(dT)-Primern zur RNA-Lösung bildeten sich aus den poly(A)-Schwänzen der Boten-RNA-Moleküle und den Primern doppelsträngige Bereiche aus, an denen die Reverse Transkriptase in Anwesenheit von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten mit der Synthese des ersten cDNA-Stranges beginnen konnte. Die Polymerase wurde nach Abschluss der Reaktion hitzeinaktiviert, und der RNA-Anteil aus dem gebildeten RNA/DNA- Hybrid durch Behandlung mit RNase H entfernt. Die so synthetisierte cDNA wurde für verschiedene PCR Ansätze eingesetzt.

2.12 *In-situ* Hybridisierung

Wenn die Methoden der Nukleinsäure-Hybridisierung direkt an einem Gewebeschnitt angewandt werden, um Messenger-RNA Moleküle im Gewebe („*in-situ*“) nachzuweisen und zu lokalisieren, spricht man von *in-situ* Hybridisierung. Die Vorgehensweise dieser Methode ist in Abbildung 2.2 skizziert.

Eine 300-400 bp lange DNA-Sequenz, die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNA entspricht, wurde in einen Transkriptionsvektor kloniert (pAL 1). Nach Linearisierung des Plasmids (durch *Bam*HI bzw. *Asp*718) wird durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen, die ihren jeweiligen Promotor erkennen, cRNA synthetisiert. Je nach Orientierung entsteht der „Antisense“-Gegenstrang, der komplementär zur Boten-RNA ist, oder der „Sense“-cRNA-Einzelstrang. Durch Einbau von ³⁵S-UTP werden die RNA-Gensonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der Gensonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte (2.17.1) bildet die Antisenseprobe ein stabiles mRNA/cRNA-Hybrid mit der Boten-RNA im Gewebe aus. RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, nicht aber das doppelsträngige Hybrid. Durch Autoradiographie wird die Hybridisierung sichtbar gemacht.

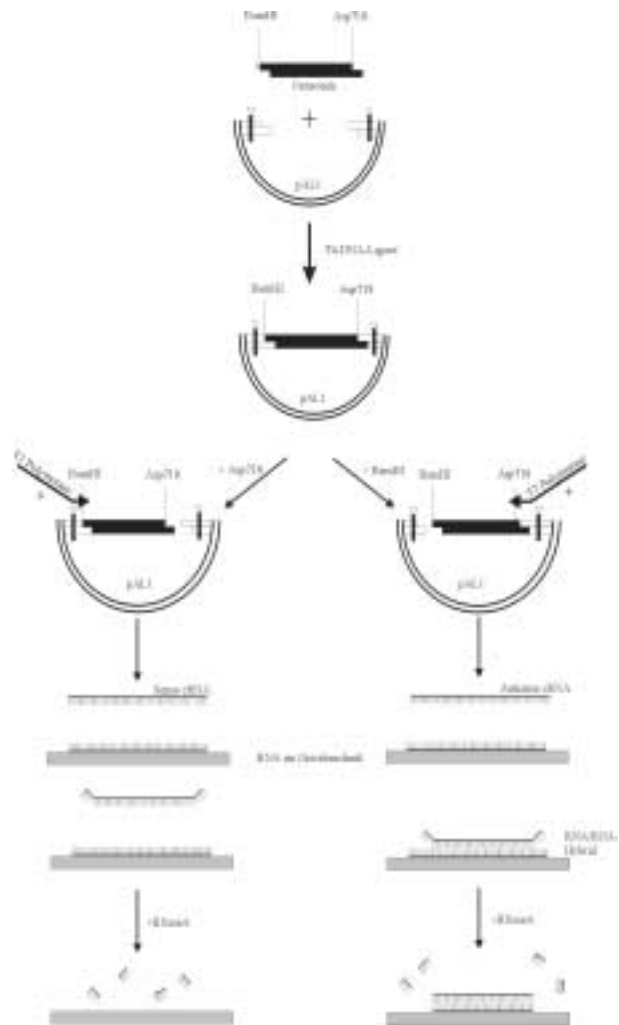


Abbildung 2.2: Schema zur Methode der *in-situ* Hybridisierung

10x PBS (pH 7,4)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

1 M TRIS

Tris-Base	121 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH mit HCl _{conc.} auf 8,0 bzw. 7,5 einstellen	

0,5 M EDTA, pH 8,0

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	186,1 g
H ₂ O	ad. 1000 ml
mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen	

5x RNase A-Puffer

5 M NaCl	250 ml
1 M Tris pH 8,0	25 ml
0,5 M EDTA pH8,0	5 ml
H ₂ O	ad 500 ml

5x Protease-Puffer

1 M Tris pH 8,0	250 ml
0,5 M EDTA pH8,0	25 ml
H ₂ O	ad 500 ml

3 M Natriumacetat, pH 5,2

Natriumacetat x 3 H ₂ O	40,8 g
H ₂ O	ad 100 ml
mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen	

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1 M DTT

Dithiothreitol (ICN)	1,5 g
3 M NaAcetat pH 5,2	33 µl
H ₂ O	ad 10 ml
sterilfiltrieren und aliquotieren bei -20 °C lagern	

Box-Puffer

Formamid	50 ml
20x SSC	20 ml
H ₂ O	ad 100 ml

50 % Dextran

Dextransulfat (MG≈5x105)	12,5 g
H ₂ O	ca. 12 ml
3 h bei 68 °C lösen	
H ₂ O	ad 25 ml
bei -20 °C lagern frisch zubereiten	

4 % PFA

Paraformaldehyd	6 g
10x PBS	15 ml
H ₂ O	ad 150 ml
bei 60 °C lösen, auf 4 °C abkühlen	

Formamid (deionisiert)

Ionenaustauscherharz (BioRad)	ca. 5g
Formamid	ca. 45 ml
bei 4 °C lagern	

50x Denhardt

Ficoll	1 g
Polyvinylpyrrolidon	1 g
BSA	1 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren, aliquotieren bei -20°C lagern	

1,25x Hybridisierungspuffer

1 M Tris pH 8,0	0,625 ml
5 M NaCl	3,75 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	0,125 ml
50x Denhardt	1,25 ml
50 % Dextran	12,5 ml
Formamid (deionisiert)	31,25 ml
H ₂ O	ad 50 ml

2.12.1 Herstellung der RNA- Gensonden

2.12.1.1 *In-vitro* Transkription

Für jede cRNA-Sonde wurden jeweils 12 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit *Bam*HI und mit *Asp*718 in zwei getrennten Ansätzen linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (2.5.3) gefällt, in 11 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die *in-vitro* Transkription wurde mit jeder Probe einmal „kalt“ getestet, d.h. die Reaktion wurde ohne radioaktiv markierte Substanzen durchgeführt und die RNA-Produkte gelelektrophoretisch untersucht. Die T7-RNA-Polymerase synthetisiert in diesem System einen RNA-Strang, der komplementär zur entsprechenden Messenger-RNA ist, die sogenannte Antisense-Sonde. Die T3-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang, der nicht komplementär sondern identisch mit der entsprechenden Boten-RNA ist, die sogenannte Sense-Sonde. Nach der *in-vitro* Transkription wurde die DNA-Matrize von DNase abgebaut und der Ansatz chromatographisch (NickTM Column, Pharmacia) aufgetrennt. Von den Fraktionen 1 bis 5 wurden jeweils 5 µl in ein Plastikgefäß pipettiert, 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktiv markierte Sonde befand sich in Fraktion 2. Sie wurde zur besseren Stabilität in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1×10^7 dpm/ml verdünnt. Das notwendige Endvolumen des Hybridisierungspuffers wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{ml (Hybr.-Puffer)} = \frac{390 \mu\text{l (Probenvolumen)} \times \text{cpm}/\mu\text{l (gemessen)} \times 1,4 \text{ dpm/cpm (Effizienzfaktor)}}{1 \times 10^7 \text{ dpm/ml (gewünschte Konzentration)}}$$

RNase-freie Transfer-RNA (Boehringer) wurde hinzugefügt, um unspezifische Bindung und Hintergrundsignal zu vermindern. Dithiothreitol diente als Antioxidans der Stabilität des Schwefel-35.

2.12.2 Standardprotokoll für die *in-situ* Hybridisierung

Das Protokoll für die *in-situ* Hybridisierung wurde in abgeänderter Form von Simmons et al. (1989) übernommen.

- Getrocknete, fixierte Gewebeschnitte (2.17.1) wurden für 15 min. mit 2 µg/µl Proteinase K in 1x Proteasepuffer vorbehandelt.
- Waschgang: 5 min. in 0,5x SSC
- Um unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden, wurde das Gewebe acetyliert:
 - 3 min. in 0,1 M TEA (Triethylammoniumacetat) pH 8,0 inkubieren.
 - 10 min. in 0,25 %iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1 M TEA

- 2 Waschschrte: je 2 min. in 2x SSC
- Entwässerung der Schnitte:
 - je 3 min. in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
 - 5 min. lufttrocknen
 - 30 min. vakuumtrocknen
- **Prähybridisierung:**

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Kammer waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Hybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Teilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Teil 1 M DTT und 1 Teil Wasser bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde Saugpapier auf den Gefäßboden gelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 42°C in einem Hybaid-Ofen.
- **Hybridisierung:**

Sense- und Antisense-Probe (mit 1×10^7 dpm/ml Hybridisierungspuffer) wurden 10 min. lang im 65 °C-Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80 µl 1 M DTT auf 1 ml Probenlösung zentrifugiert (2 min. 2000 rpm). 30 bis 100 µl Antisense- bzw. Sense-Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, die man danach bei 55 °C für etwa 16 Stunden im Ofen inkubierte.
- Die Objektträger wurden am nächsten Tag von unspezifisch gebundener Probe befreit. Um den im RNA/RNA-Hybrid gebundenen Schwefel-35 zu stabilisieren, enthielten die Waschlösungen 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- und Antisense-Probe hybridisierten Schnitte wurden völlig gleich behandelt:
 - 2 Waschschrte: je 10 min. in 2x SSC
 - RNase A-Verdau: 30 min. in 20 µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer

RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, RNA/RNA-Hybride werden nicht verdaut

 - 2 Waschschrte: je 10 min. in 2x SSC
 - 2 Waschschrte: je 1 Stunde in 0,1x SSC bei 60 bis 70 °C
 - 3 Waschschrte: je 10 min. in 0,5x SSC
 - Entwässern:
 - * je 3 min. in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
 - * 5 min. lufttrocknen
 - * 30 min. vakuumtrocknen

Die verdünnten Ethanolösungen enthielten jeweils 2,3 % Ammoniumacetat, um das RNA/RNA-Hybrid zu stabilisieren.

Die trockenen Objektträger wurden auf Karton geklebt und ein Film (Kodak BioMax MR) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4 °C wurde der Film entwickelt.

2.12.3 Filmemulsion

Ob in einem Gewebe eine *in-situ* Hybridisierung stattgefunden hat, konnte anhand des exponierten Filmes geklärt werden. Um die Lokalisation der hybridisierten mRNA aber auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, war eine Mikroautoradiographie notwendig. Die

Objektträger mit den markierten Gewebeschnitten mussten mit einer Filmemulsion überzogen werden, die nach Exposition für 7-10 Wochen entwickelt wurde. Unter dem Lichtmikroskop konnten das Gewebe und die darüber liegenden Silberkörner, die dem radioaktiven Signal entsprechen, untersucht werden.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt:

- Die Filmemulsion Kodak NTB-2 (Kodak) wurde im 42°C Wasserbad aufgeschmolzen.
- Die von Staubkörnern befreiten Objektträger wurden nacheinander in die Emulsion getaucht, langsam herausgezogen und senkrecht in einen Metallständer gestellt.
- Die Objektträger wurden nach dem Trocknen der Emulsion in einer lichtdichten Box mit viel Trockenmittel (Silicagel) für etwa 8 Wochen bei 4°C gelagert.

Entwicklung der Filmemulsion:

Die Entwicklerlösung (Kodak Developer D1-19) musste mit Wasser 1:1 verdünnt werden. Anschließend wurden Entwickler und Fixierlösung (Kodak Fixer) filtriert und auf 15°C temperiert. Der Entwicklungsvorgang wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 4 min in den Entwickler
- 10 sec. in Wasser,
- 5 min. in den Fixierer,
- 5 min. in Wasser.

Anschließend ließ man die Objektträger noch mindestens 30 min im Wasser stehen, bevor sie gefärbt wurden. Die Emulsionsschicht auf der Rückseite der OT wurde nach dem Trocknen mit einem Skalpell entfernt.

2.13 Isolierung und Präparation von Proteinen

2.13.1 Sinusknoten

Das Herz wurde mit den großen Gefäßen aus einer Maus entfernt und umgehend in auf 37°C temperierte Tyrode-Lösung gegeben. Ein kleines Gewebstück (~ 1 mm²) vom Übergang der Vena cava superior in den rechten Vorhof, das den Sinusknoten enthielt, wurde unter einem Stereomikroskop (Zeiss) exzidiert. Der isolierte Sinusknoten kontrahierte in Tyrode-Lösung weiterhin spontan. Das Gewebstückchen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in diesem Zustand mit einem Mörser fein zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebepulver mit 2% SDS / 50 mM Tris-HCl für 10 min bei 95°C erhitzt. Der so hergestellte Sinusknoten-Gesamtproteinextrakt konnte direkt nach Zugabe des Probenpuffers in die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt werden.

2.13.2 Embryoherz

Aus schwangeren Mäusen wurde an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung der Uterus entfernt und die Embryonen vorsichtig in 4°C kalter PBS Lösung unter einem Stereomikroskop (Zeiss) freigelegt. Die embryonalen Herzen wurden anschließend isoliert und bei –80°C gelagert. Um eine genügend hohe Ausbeute an Gesamtprotein zu erhalten, wurden 9 bis 15 Herzen, je nach Entwicklungsstadium, gepoolt und im tiefgefrorenen Zustand in Puffer A plus Proteaseinhibitoren (4°C) aufgenommen. Mit Hilfe eines Potters wurde die Gewebesuspension homogenisiert und bei –80°C gelagert.

Puffer A

50 mM Tris, pH 7,5
5 mM EDTA
ad 500 ml H₂O ; autoklavieren

Proteaseinhibitoren

1 mg/ml Leupeptin (Calbiochem) in 50% Ethanol
1 mM Pepstatin A (Calbiochem) in 50% Ethanol
1 mg/ml Antipain (Calbiochem) in 50% Ethanol
100 mM PMSF (Fluka) in 100% Ethanol
1 M 1,10-Phenanthrolin (Fluka) in 100% Ethanol
300 mM Iodacetamid (Serva) in H₂O
1 M Benzamidin (Sigma) in H₂O

Die Proteaseinhibitoren wurden erst kurz vor Gebrauch zugesetzt und dabei auf 1/1000 verdünnt.

2.14 Aufreinigung des HCN4 spezifischen Peptidantikörper

Von der Firma Gramsch wurde Immunsereum aus Kaninchen gegen das carboxyterminal im Kanal gelegene Peptid pHCN4 (NH₂-TAAPQREPGARSEPVRSK-COOH) bezogen. Zur Aufreinigung aus dem Serum wurde das reduzierte Peptid an SulfoLink-Sepharose (Pierce) gekoppelt, daraus eine Säule erstellt und 3 ml des Immunsereums verdünnt in PB, 0,5 M NaCl bei 4°C 16 h über diese Säule zirkuliert. Der gebundene Antikörper konnte mit 5 M MgCl₂ von der Säule eluiert werden. Er wurde über Ultrafiltration (Amicon-G 30) aufkonzentriert und in Aliquots bei –80°C gelagert.

2.15 Analyse und Detektion von Proteinen

2.15.1 Proteinbestimmung mit BCA

Es handelt sich hierbei um eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Smith et al, 1985), die eine Modifikation des von Lowry 1951

beschriebenen Prinzips darstellt. Dabei werden Metallionen in alkalischer Lösung durch Proteine reduziert; aus zweiwertigen entstehen einwertige Kupferionen, die mit einem spezifischen Reagenz, der 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure) (BCA) einen violett gefärbten Komplex bilden. Die Extinktion dieses Komplexes kann bei 540 nm gemessen werden. Da die Intensität der Färbung von Reaktionszeit und Temperatur abhängt, muss bei jeder Bestimmung eine Eichkurve mit Lösungen bekannter Konzentration angefertigt werden.

Das instabile BCA Reagenz wurde jeweils kurz vor Gebrauch aus dem Reagenz A und B (Pierce) im Verhältnis 50 zu 1 angesetzt, mit der verdünnten Proteinlösung (1:50 bis 1:300) gemischt, für 60 min bei 60°C inkubiert und die Farbreaktion über einen ELISA-Reader (Titertek) ausgewertet. Anhand der Werte der Standards ließ sich die gesuchte Proteinkonzentration berechnen.

Reagenz A:

1% 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)-Na₂
0,95% NaHCO₃
0,4% NaOH
2% Na₂CO₃ x H₂O
0,16% Na₂-tartrat

Reagenz B:

4% CuSO₄ x H₂O

Proteinstandards:

0,5; 1; 2; 3; 4 µg BSA/50µl H₂O

2.15.2 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen wurde mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Das SDS hat einerseits die Aufgabe Proteine zu denaturieren und Komplexe und Multimere in ihre Untereinheiten zu dissoziieren, zum anderen lagert es sich um die gelösten Moleküle und verleiht dadurch jedem Protein eine negative Partialladung, die zur Molmasse des Proteins ungefähr proportional ist.

Es wurde eine Mini-Gel Apparatur der Firma Biorad (Mini Protean II Cell) verwendet. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgehoben, das Sammelgel darauf gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Precision Protein StandardsTM(Biorad)" verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 150 V.

4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4% SDS

4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,4% SDS

7,5% Trenngel

Acrylamid	3,75 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml
H ₂ O	7,5 ml
20% APS	25 µl
TEMED (Roth)	10 µl

Sammelgel

Acrylamid	0,65 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
20% APS	12,5 µl
TEMED (Roth)	5 µl

4x Laemmli-Puffer

0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
10% β-Mercaptoethanol
5% SDS
40% Glyzerin
0,004% Bromphenolblau (Sigma)

10x SDS-Laufpuffer pH 8,3

250 mM Tris-HCl
1,92 M Glycin
1% SDS

Acrylamid

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid
(Rotiphorese Gel 30, Roth)

2.15.3 Western-Blot

Die Anwesenheit bestimmter Proteine in Zell- und Gewebsextrakten wurde durch Western-Blotanalyse nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore) transferiert. Durch Bindung spezifischer Antikörper konnten Proteine durch Enzymgekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzymsubstrat-vermittelte Farbreaktion detektiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den Angaben des Herstellers, Spenderorganismus und entsprechender Verdünnung im Anhang (5.2) zu finden.

2.15.3.1 Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren

Für das Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) wurden Filterpapiere (GB001 Gel Blotting Papier; Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, mit den entsprechenden Puffern getränkt und wie in Abb. 2.3 zwischen Anode und Kathode aufgebaut.

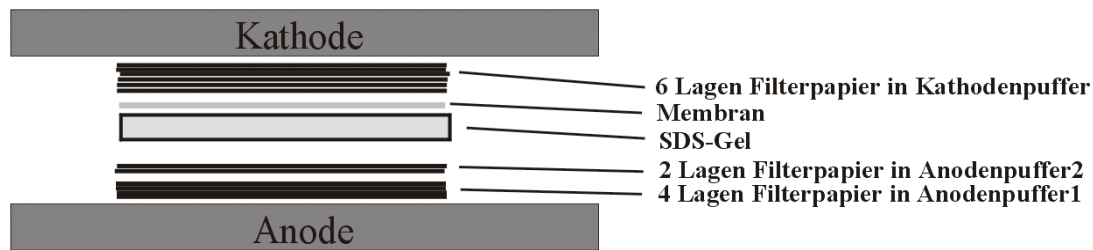


Abbildung 2.3: "Semidry" Blot Aufbau

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch Blotten mit konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h.

Anodenlösung I

300 mM Tris-HCl, pH 10,4
20% Methanol

Anodenlösung II

25 mM Tris-HCl, pH 10,4
20% Methanol

Kathodenlösung

25 mM Tris-HCl, pH 7,6
40 mM ϵ -Aminohexansäure
20% Methanol

10x TBST

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
1,5 M NaCl
1% Tween 20

2.15.3.2 Immundetektion:

Die Membran wurde, um freie Protein-Bindungsstellen zu blockieren, mit 3% BSA in 1x TBST über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nach mehreren Waschschritten mit 1x TBST wurde die Membran für 2 h mit einem spezifischen primären Antikörper (in 1x TBST + 3% BSA + 0,05% NaN_3) bei RT inkubiert. Im Anschluss wieder mit 1x TBST gewaschen und mit einem sekundären Antikörper (Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase) inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Membran wieder mehrmals in 1x TBST gewaschen.

Um die Meerrettich-Peroxidase nachzuweisen, wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion (Roswell und White, 1978) benutzt. Dazu wurde das Luminol-beinhaltende ECL (enhanced chemiluminescence)-System (Amersham) verwendet. Die beiden enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt und für 1 min mit der Membran inkubiert. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert die Peroxidase das Luminol, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese konnte mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert werden.

2.16 Gewebepvorbereitung für die *in-situ* Hybridisierung bzw. Immunhistochemie

2.16.1 Anfertigen von Gewebeschnitten

Die Mausgewebe (Herz und Embryo) wurden nach Entnahme in 4°C kaltem PBS gespült und in Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Gewebe über eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und in Paraffin (Paraplast X-Tra, Sigma) eingebettet. Als Übergangsmedium fand Toluol Verwendung. Die verwendeten Paraformaldehyd Konzentrationen und Zeiten sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

	Herzgewebe	Embryonen
Fixierung	2% PFA, 2,5 h, RT	4% PFA, 2 h, 4°C
Ethanolreihe: 50% / 70% / 95% / 100% / 100%	je 1 h, 4°C	je 3 min, RT
Toluol-Ethanol 1:1 Toluol 100%	je 0,5 h, RT	je 3 min, RT
Paraffin I-III	jeweils 4-16 h	jeweils 4-16 h

Tabelle 2.2: Gewebebehandlung für Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mittels eines Rotationsmicrotom (Microm HM 335 E) in 10 µm Dicke geschnitten und auf OT (Polylysine, Menzel Gläser) aufgezogen. Die OT wurden anschließend für 3 h bei 60°C gebacken und bei Raumtemperatur unter trockenen Bedingungen gelagert. Vor der immunhistologischen Färbung bzw. *in-situ* Hybridisierung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert.

Entparaffinieren: 100% Toluol, 2x 10 min

Rehydrieren: 100%-, 90%-, 80%-, 70%-Isoropropanol, jeweils 5 min

in PBS waschen; darauf achten, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen!

2.16.2 Sinusknotenzellisolierung

Wie in 2.14.1 beschrieben wurde der Sinusknoten isoliert und anschließend in mehrere kleine Stücke geschnitten. Diese wurden mit 10 mg/ml Collagenase B (Roche) und 5 mg/ml Elastase (Roche) in Tyrode-Low-Lösung für 30 min bei 35°C verdaut. Nach dem Verdau wurden die Gewebestücke in mehreren Wasch-/ Zentrifugenschritten von den Enzymen gereinigt und in KBI-Lösung für 2 h bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit einer Pipette behutsam mechanisch vereinzelt und unter Verwendung eines CytoSpin3 (Shandon) auf die OT zentrifugiert (1000 rpm, 1 min). Unter Verwendung einer 2%igen PFA-Lösung wurden die

Zellen für 15 min bei 4°C fixiert und in PBS (4°C) ÜN gelagert. Die so vorbehandelten OT wurden zur Immunfärbung verwendet.

Tyrode-Low		Tyrode		KB I (mod. Kraftbrühe)	
NaCl	140 mM	NaCl	140 mM	KCl	25 mM
KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM	L-Glutamat	80 mM
CaCl ₂	0,2 mM	CaCl ₂	1,8 mM	Taurine	20 mM
MgCl ₂	0,5 mM	MgCl ₂	1 mM	KH ₂ PO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	HEPES-NaOH	5 mM	MgCL ₂	3 mM
Taurin	50 mM	D-Glucose	5,5 mM	D-Glucose	10 mM
HEPES-NaOH	5 mM	<i>pH 7,4 mit NaOH</i>		HEPES-NaOH	10 mM
D-Glucose	5,5 mM			EGTA	0,5 mM
BSA	1 mg/ml			<i>pH 7,4 mit KOH</i>	
<i>pH 6,9 mit NaOH</i>					

2.17 Immunhistochemie

Um die Verteilung und Anwesenheit von Proteinen im Gewebeschnitt oder auf Einzelzellen zu analysieren wurden immunhistochemische Methoden angewandt. Zur Verwendung kam hierfür ein Immunperoxidase System (Vectastain ABC System; Vector Laboratories) oder Fluoreszenz-markierte Antikörper, die anschließend durch konfokale Laser-Scan Mikroskopie detektiert wurden.

2.17.1 Immunhistologische Färbungen mittels Peroxidase

Hierzu wurde das Vectastain ABC System (Vector Laboratories) verwendet, das sich aus Avidin (Glykoprotein, das eine extrem hohe Affinität zu Biotin besitzt) und einer biotinylierten Peroxidase (aus Meerrettich) zusammensetzt. Werden diese beiden Substanzen gemischt, so bilden sie einen sehr stabilen Complex. Zunächst werden die Gewebeschnitte mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der gegen IgGs der Spezies des ersten Antikörper gerichtet und biotinyliert ist (*Goat Anti Rabbit Vectastain*). Anschließend wird der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zugegeben. Die Peroxidaseaktivität wird schließlich durch das Substrat Diaminobenzidin (DAB; Sigma) detektiert, das ein braunes Präzipitat auf den Schnitten oder Einzelzellen bildet. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ohne primären Antikörper inkubiert.

Die gefärbten Präparate wurden anschließend mit dem Mikroskop Axioskop (Zeiss) im Hellfeld bei einer Vergrößerung von 100-400x ausgewertet und fotografiert. Zur

Dokumentation wurde entweder eine Nikon Kamera Typ F 301 mit einem Kodakfilm (EPY 64 T) oder eine digitale Kamera (Nikon D1x) verwendet. Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde das Computerprogramm „Adobe Photoshop 5.5“ verwendet.

2.17.2 Immunhistologische Färbung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper

Dafür wurden grün fluoreszierende Cy2- (Carbocyanin) bzw. rot fluoreszierende Cy3- (Indocarbocyanin) gekoppelte sekundäre Antikörper (Dianova) eingesetzt. Die Spezifität des Signals wurde durch Weglassen des primären Antikörpers überprüft.

Die Analyse der Schnitte erfolgte durch konfokale Laser-Scan Mikroskopie (LSM 510 Zeiss Axiovert 100). Die fluorochromen Konjugate wurden von einem Krypton-Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm (zur Detektion von Cy2) bzw. von einem Helium-Neon Laser bei 543 nm (für Cy3) angeregt und die optischen Einzelschnitte mit verschiedenen Objektiven und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen. Bei den Kontrollexperimenten zur Spezifität der einzelnen Antikörper wurde besonders darauf geachtet, die Einstellung der Lochblende („pinhole“) und die Empfindlichkeit des Restlichtverstärkers konstant zu halten.

2.17.3 Protokoll für die Immunhistochemie

- **Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität**, OT werden mit 6% H₂O₂, 1% Methanol in PBS für 20 min inkubiert (nur bei Gewebeschnitten nötig)
- Durchführung des „**Antigen Retrieval**“ mittels einer Mikrowelle (Moulinex). Damit wird die Antigenpräsentation und somit die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper maximiert. Die OT werden 15 min in Citratpuffer inkubiert und anschließend für ca. 40 sek. mit Mikrowellenstrahlen behandelt
- Freie Proteinbindungsstellen werden mit 10% NGS (Normal Goat Serum, Vectastain) in TBST für 2h bei RT blockiert

Immunhistochemie

- Den **Primären Antikörper** in 5% NGS-TBST verdünnen (siehe 5.2), auf die Schnitte/ Zellen aufgeben und ÜN bei 4°C inkubieren
- OT 3x für 15 min in TBST waschen
- **Sekundären Antikörper** (biotinylierte Goat-anti-rabbit IgG; Vectastain) 1:200 in 5%-NGS-TBST verdünnen und für 1 h bei RT auf die Schnitte geben
- OT 3x für 15 min in TBST waschen
- **AB-Komplex** auf die gewaschenen Schnitte/

Immunfluoreszenz

- Den bzw. die **Primären Antikörper** in 3% BSA-TBST verdünnen (siehe 5.2), auf die Schnitte/ Zellen aufgeben und ÜN bei 4°C inkubieren
- OT 3x für 15 min in TBST waschen
- Den bzw. die **Sekundären Antikörper** (Cy2- bzw. Cy3-gekoppelt; in 3%-BSA-TBST verdünnen, auf die Schnitte geben und 1h bei RT im Dunklen inkubieren
- OT vor Licht geschützt 3x für 15 min in TBST waschen
- Gewebeschnitte niemals austrocknen lassen

Zellen geben und 1 h inkubieren

- OT 3x für 15 min in TBST waschen
- Färbung mit 0,05% **DAB** in PBS (+ 1 µl 30% H_2O_2 pro 2,5 ml) 2-10 min; Reaktion durch Waschen mit PBS stoppen
- Gewebeschnitte niemals austrocknen lassen

Die OT wurden mit Aquatex (Merck) eingebettet.

Citratpuffer

NaH_2PO_4 0,2M

Na_3Citrat 0,1M

pH 4,7 mit HCl

2.18 X-Gal Färbung

Das für die β -Galactosidase kodierende lacZ-Gen von E. coli wird in großem Umfang als Reportergen für Genexpressionsstudien in den verschiedensten Systemen eingesetzt. X-Gal ist eine allgemeine Abkürzung für 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid, ein sensibler Farbindikator für β -Galaktosidase Aktivität. Das farblose X-Gal wird durch die β -Galactosidase hydrolysiert und in weiteren Reaktionen oxidiert und zu einem blauen unlöslichen Indigofarbstoff dimerisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mausgewebe für die X-Gal Färbung verwendet. Die isolierten Gewebe wurden dazu mit einer Fixierlösung (2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd) behandelt, mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht unter Lichtausschluss mit der Färbelösung [5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) in PBS] inkubiert.

2.19 Histologische Färbungen

Um die Morphologie von Gewebeschnitten untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Färbemethoden angewandt.

- **Toluidinblau-Färbung** stellt sowohl Kerne als auch Zytoplasma blau dar.
- **Hämatoxylin/Eosin (HE)** färbt die Kerne blauviolett und das Zytoplasma rosa.

Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) oder Aquatex (Merck) und Deckgläschen bedeckt.

Hämatoxylin-Lösung nach Harris (Sigma):

Hämatoxylin 7,5 g/l

Toluidinblau-Lösung:

Toluidinblau (Sigma) 10 g/l

Eosin-Lösung:

Eosin Y 6,0 g

Phloxin B 1,5 g

70 % Ethanol ad 250 ml

HE-Färbung

- OT für 15 sek. in die Hämatoxylinlsg.
- 2x2 min in H₂O
- 5 sek. in 0,1% Amoniaklsg (frisch)
- 2x2 min in H₂O
- für 15 sek. in Eosinlösung
- 8x in 95% Ethanol tauchen
- 8x in 100% Ethanol tauchen
- 2 min in 100% Ethanol
- 2x2 min in Xylol

Toluidinblau

- OT für 10-30 min in die Toluidinblaulsg.
- 3x in H₂O tauchen
- in 30% Ethanol nach Bedarf entfärben
- trocknen lassen
- 2x2 min in Xylol

2.20 Elektrophysiologische Untersuchungen

Alle elektrophysiologischen Untersuchungen führte Frau Dr. Stieber durch.

2.20.1 Isolierung der embryonalen Kardiomyozyten

Für die elektrophysiologischen Aufzeichnungen wurden die aus Embryonen isolierten Herzen in frischem ADS Puffer mit 0,5 mg/ml Collagenase B (Boehringer) und 1,0 mg/ml Pancreatin (Gibco) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Zellgewebe mechanisch vereinzelt, auf polylysierte Deckgläschen ausgesät und in mit 10% fetalen Kälberserum (Biochrom) versetzten Dulbecco's MEM Medium (DMEM, Gibco) bei 37°C, 10% CO₂ aufbewahrt.

ADS Puffer

NaCl	116 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	0,8 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
HEPES	20 mM
Glucose	5,5 mM

pH 7,3

2.20.2 Elektrophysiologische Messungen

24 Stunden nach Isolierung der embryonalen Kardiomyozyten wurde entweder I_h in der Ganzzell (*whole cell*) Konfiguration bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ oder Aktionspotentiale in der perforierten Patch (*perforated patch*) Konfiguration bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mithilfe eines Axopatch 200B Verstärker und pClamp7-Software aufgezeichnet.

Für die I_h Messung wurde das Membranpotential zuerst bei -40 mV gehalten. Um dann den Einwärtsstrom auszulösen, wurden Potentialsprünge im Bereich von -30 mV bis -140 mV (3 Sekunden Dauer), gefolgt von einem Schritt auf -140 mV angelegt. Zur Berechnung der Stromdichte wurde die Amplitude durch die Zellkapazität geteilt.

extrazelluläre Badlösung

NaCl	120 mM
KCl	20 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
BaCl ₂	2 mM
CdCl ₂	0,3 mM

pH 7,4 mit NaOH

intrazelluläre Pipettenlösung

NaCl	10 mM
KCl	30 mM
K-Asp	90 mM
MgSO ₄	1 mM
Mg-ATP	3 mM
EGTA	5 mM
HEPES	10 mM

pH 7,4 mit KOH

Für die AP-Aufzeichnungen wurden die Zellen mit Tyrode Lösung umspült. Die intrazelluläre Pipettenlösung beinhaltete (in mM): 10 NaCl, 130 K-Asp, 0,04 CaCl₂, 5 Mg-ATP, 5 Creatin-Phosphat, 10 HEPES + 200 µg/ml Amphotericin B. Für die durch cAMP stimulierten Frequenzmessungen wurde die Tyrode Lösung zusätzlich mit 1×10^{-4} M 8-Br-cAMP versetzt (Stieber et al, 2003).

2.21 Versuchstiere

2.21.1 „Gefloخته“ HCN4 (HCN4^{L2}) Mäuse

In der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Ludwig wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine „gefloخته“ HCN4^{L2} Mauslinie hergestellt, in deren Genom das Exon 4 des HCN4 Gens durch zwei gleich orientierte *loxP* Sequenzen flankiert ist (*L2*, da 2 *loxP* Sequenzen). Die Mäuse hatten einen reinen Sv/129 genetischen Hintergrund und wurden auf einen C57Bl/6 genetischen Hintergrund rückgekreuzt.

2.21.2 Zuchtschema zur Generierung einer HCN4-defizienten Maus

Die „geflochten“ HCN4 Mäuse wurden mit Cre „deleter“ (CMV-Cre) Mäusen verpaart. Diese Cre Maus exprimiert die Cre Rekombinase in allen Zellen, inkl. Keimzellen. Dadurch kann ein keimbahngängiges $HCN4^{L1}$ (L1, da 1 loxP Sequenz) Allel erzeugt und damit eine konventionelle Knock-out Mauslinie ($HCN4^{L1/L1}$) etabliert werden.

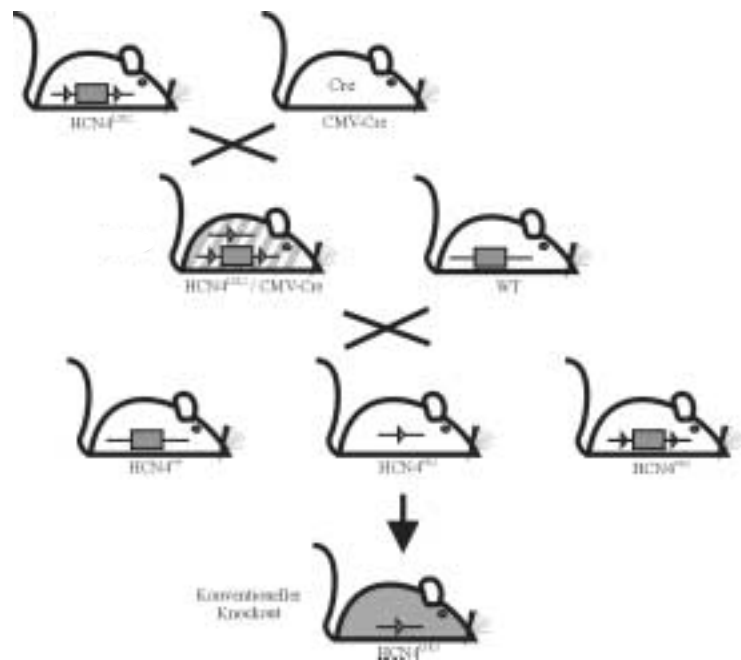


Abbildung 2.4: Generierung eines globalen HCN4 Knock-out

2.21.3 Zuchtschema zur Generierung konditional HCN4-defizienter Mäuse

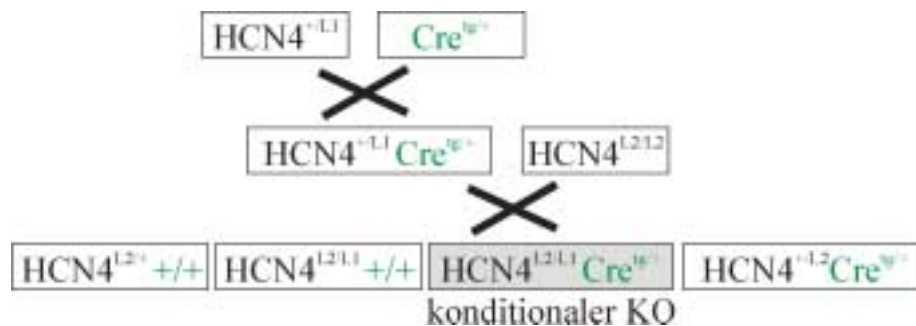


Abbildung 2.5: Schema zur Generierung eines konditionalen HCN4 Knock-out

Heterozygote Nullmutanten ($HCN4^{+L1}$) wurden mit Cre-Mäusen verpaart. Der aus dieser Verkreuzung hervorgegangene Genotyp ($HCN4^{+L1}/Cre^{tg/+}$) wurde mit $HCN4^{L2/L2}$ Tieren zusammengesetzt. Die daraus resultierenden konditionalen Knock-out Mäuse ($HCN4^{L2/L1}/Cre^{tg/+}$) exprimieren die Cre Rekombinase Promotor-kontrolliert nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen. Eine Exzision des „geflochten“ Allels findet nur in den Zellen statt, in welchen das Cre Enzym aktiv ist. Dadurch werden diese Zellen zu Knock-out ($HCN4^{L1/L1}$) Zellen. In den nicht Cre-exprimierenden Geweben bleibt das HCN4^{L2}-Allel und damit das HCN4 Protein erhalten. Bei der Verwendung einer induzierbaren Cre Maus wird

das Cre Enzym erst nach der Gabe eines synthetischen Pharmakons (Tamoxifen oder RU486) in den Zellkern aufgenommen. Dadurch kann der Zeitpunkt der Rekombination frei gewählt werden.

2.21.4 Kontrollierte Verpaarung

Um den genauen Schwangerschaftstag und das genaue Alter der Mausembryonen bestimmen zu können, wurden die Mäuse kontrolliert verpaart. Am Abend wurden hierfür ein Weibchen und ein Männchen zusammengesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf (plug) hin, bestehend aus männlicher Spermaflüssigkeit, untersucht. Im Falle eines sichtbaren Pfropfs wurde dieser Tag als Tag 0,5 der Schwangerschaft bzw. als Alter des Embryos festgelegt. Die Embryos wurden dann zu den gewünschten Tagen (ET 8,5; 9,5; 10,5; 11,5 und 14,5) aus dem Uterus herauspräpariert.

2.21.5 Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem geeigneten Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München gehalten. Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer „Zuchtdiät für Ratten und Mäuse“ (Altromin 1314) gefüttert und mit Trinkwasser versorgt. Die Nachkommen wurden im Alter von 7-14 Tagen genotypisiert, im Alter von 4 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

2.22 Tamoxifen Zubereitung

Tamoxifen (Sigma T-5648) wurde in Miglyol[®] (Mittelkettige Triglyceride, Caelo) in einer Konzentration von 2 mg/100 µl gelöst. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 37°C erwärmt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung einer HCN4-defizienten Mauslinie

Die Generierung von Gen-defizienten Mäusen nimmt in der modernen Grundlagenforschung einen hohen Stellenwert ein. Durch die gezielte Ausschaltung einzelner Gene ist es möglich, deren Funktion am lebenden Tier zu analysieren. Mit dem Cre *loxP* System steht ein Werkzeug zur Verfügung, dass eine gewebsspezifische und zeitlich frei wählbare Gen-Deletion gestattet.

Dieses Cre *loxP* System wurde verwandt, um die Funktion von HCN4 *in-vivo* in der Maus zu untersuchen. Hierfür wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Ludwig in Vorarbeit zu den hier dargestellten Untersuchungen eine Maus erzeugt, bei der das 4. Exon des HCN4 Gens durch zwei *loxP* Sequenzen gleicher Orientierung flankiert ist (Abb. 3.1). Das 4. Exon im HCN4 Gen codiert für die Porenregion und für das 6. Transmembransegment und ist daher von essentieller Bedeutung für die Funktion des Ionenkanals. Nach Cre-vermittelter Exzision wird das 4. Exon aus dem Gen deletiert und so ein funktioneller "Knock-out" erzeugt. Diese Deletion kann durch die Wahl der eingesetzten Cre Transgene ubiquitär, gewebsspezifisch und / oder zeitspezifisch erfolgen.

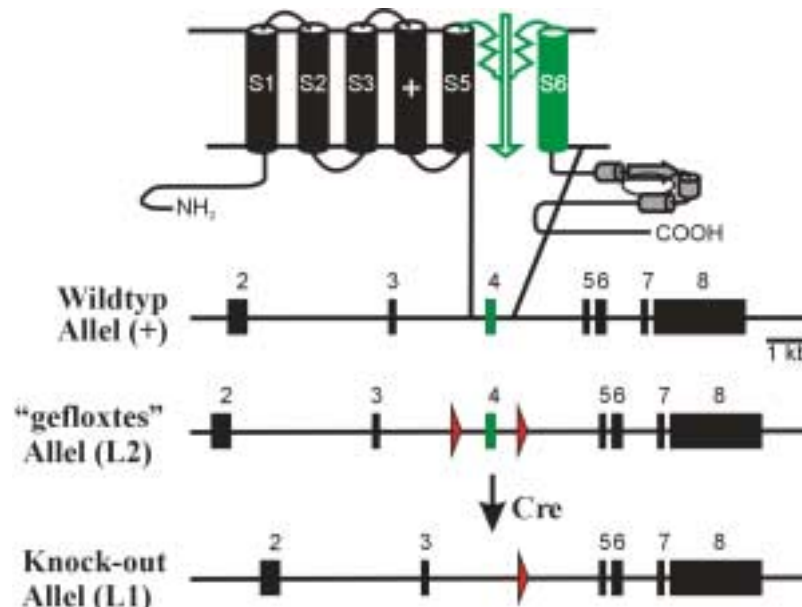


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Generierung HCN4-defizienter Mäuse mit Hilfe des Cre *loxP* Systems

Dargestellt ist schematisch der HCN4-Kanal mit seinen 6 Transmembransegmenten und der Pore zwischen 5. und 6. Transmembransegment. Grün sind die Bereiche dargestellt, für die das 4. Exon kodiert. Darunter der Wildtyp Genort (HCN4⁺-Allel), das HCN4^{L2}-Allel und das HCN4^{L1}-Allel (Nullallel) welches durch Cre-vermittelte Exzision des "gefloxten" Exon 4 entsteht.

Durch Verpaarung der „geflochten“ HCN4 Tiere ($\text{HCN4}^{\text{L2/+}}$) mit einer Cre „Deleter“ (CMV-Cre) Maus wurden heterozygote HCN4-defiziente Tiere ($\text{HCN4}^{\text{L1/+}}$) hergestellt (siehe auch Material & Methoden 2.4.3).

3.2 Analyse der ubiquitär HCN4-defizienten Mäuse

3.2.1 Ubiquitär HCN4-defiziente Mäuse sterben *in-utero*

Aus den Verpaarungen zwischen heterozygoten Mäusen ($\text{HCN4}^{\text{L1/+}}$) kamen keine lebenden Knock-out Tiere ($\text{HCN4}^{\text{L1/L1}}$) zur Welt. Bei den Nachkommen handelte es sich ausnahmslos um Wildtypen ($\text{HCN4}^{+/+}$) oder heterozygote Tiere. Dabei waren ein Drittel aller Nachkommen Wildtyp (49/146) und zwei Drittel Heterozygot (97/146). Diese Daten weisen darauf hin, dass homozygote HCN4-defiziente Tiere nicht lebensfähig sind und noch während der embryonalen Phase sterben. Dagegen unterscheiden sich heterozygote Tiere in Vitalität und Lebenserwartung nicht von Wildtypen. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte mittels PCR-Analyse. Die verwendeten Primer und deren Lage ist in Abb. 3.2 dargestellt.

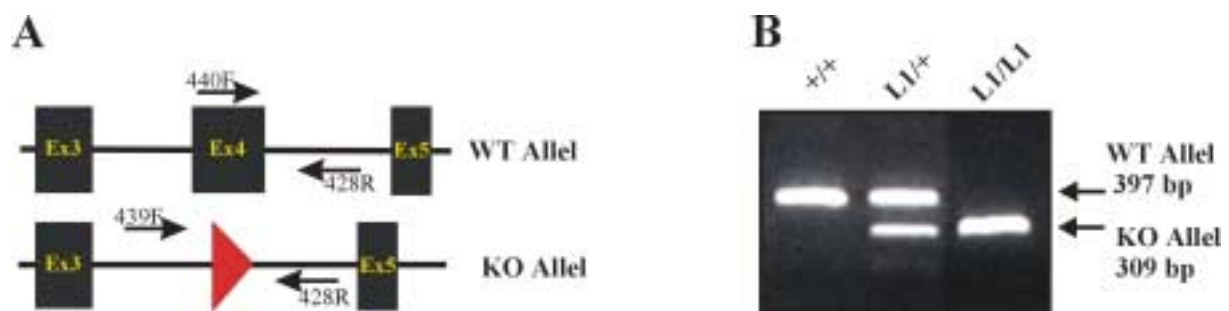


Abbildung 3.2: Genotypisierung

(A) Lage der einzelnen Primer (440F/439F/428R) im Wildtyp (WT)- und Knock-out (KO)- Allel; (B) Banden amplifiziert mit PCR unter Verwendung der in (A) beschriebenen Primer und DNA verschiedener Embryonen im 2%igen Agarose-Gel.

3.2.2 HCN4-defiziente Mäuse sterben in der Embryonalentwicklung zwischen Tag 10 und 11,5

Die embryonale Entwicklung umfasst bei der Maus einen Zeitraum von 19-20 Tagen und wird in verschiedene Entwicklungsphasen unterteilt. Um den pränatalen Todeszeitpunkt der HCN4-defizienten Tiere näher zu bestimmen, wurden schwangeren Weibchen zu definierten Zeitpunkten die Embryonen entnommen, auf Vitalität untersucht und genotypisiert (Tabelle

3.1). Die Untersuchung beschränkte sich auf rein äußerliche Auffälligkeiten wie Aussehen und Herzkontraktion.

ET	Nachkommen (gesamt)	+/+	+/L1	L1/L1
9,5	83	21	42	20
10,5	90	20	50	20*
11,5	7	1	3	3 (tot)
14,5	7	0	6	1 (tot)

Tabelle 3.1: Bestimmung des embryonalen Todeszeitpunktes HCN4-defizienter Tiere

ET: Embryonaler Tag, +/+ : Wildtyp, +/L1: Heterozygot, L1/L1: homozygoter Knock-out. Angegeben ist die Zahl der untersuchten Embryonen. *: 3 von 20 Embryonen zeigten keine Herzkontraktion

An den embryonalen Tagen (ET) 9,5 und 10,5 zeigten die HCN4-defizienten Embryonen keine äußerlichen Auffälligkeiten. Sie waren in Größe, Form und Entwicklungsstadium nicht von ihren Geschwistern zu unterscheiden. Dennoch war bei 3 der 20 untersuchten Knock-out Embryonen am ET 10,5 keine Herzkontraktion festzustellen. Dagegen waren am ET 11,5 alle untersuchten Knock-outs abgestorben und durch ihre blasse Farbe und verringerte Größe klar von den beiden anderen Genotypen zu unterscheiden. Am ET 14,5 konnte Knock-out DNA nur noch aus stark resorbiertem embryonalem Gewebe amplifiziert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass die HCN4-defizienten Tiere nach dem embryonalen Tag 10 und vor dem ET 11,5 *in-utero* versterben.

3.2.3 Molekularbiologische Überprüfung des Knock-out Ereignisses

Ausgehend von embryonalem Gewebe wurde das Rekombinationsereignis und der Erfolg der Knock-out Strategie mit molekularbiologischen Methoden wie Southern-Blot Hybridisierung und RT-PCR überprüft. Die für die Southern-Blot Analyse verwendete DNA wurde aus jeweils zwei kompletten Embryonen am Tag 11,5 p.c. isoliert.

Im Autoradiogramm (Abb. 3.3) erkennt man, dass im Knock-out Embryo beide Allele des HCN4 Gens gegenüber Wildtyp um jeweils 0,9 kb verkürzt sind. Das stimmt mit den theoretisch berechneten Bandengrößen von 5,2 kb für das Wildtyp Allel und 4,3 kb für das

Knock-out Allel überein. Dies lässt auf eine erfolgreiche Rekombination auf genomischer Ebene schließen.

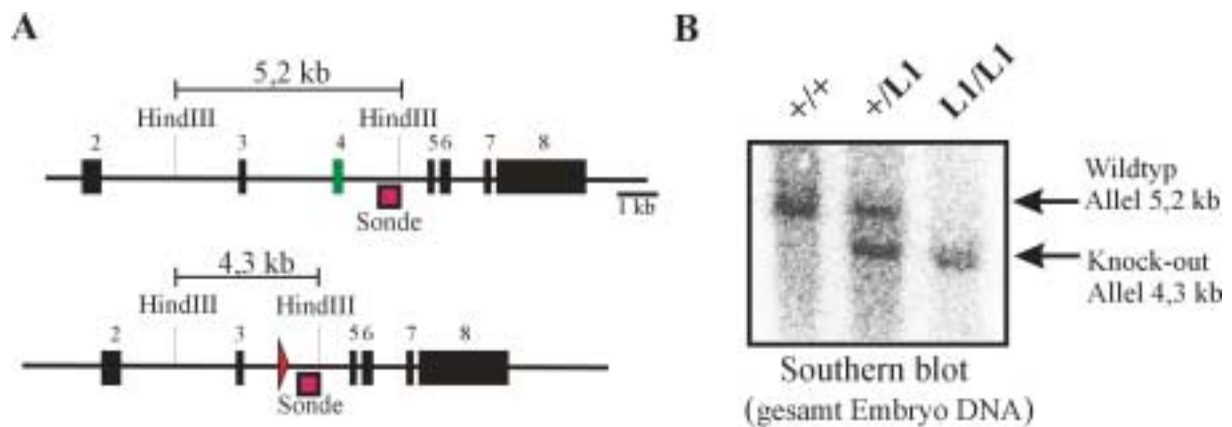


Abbildung 3.3: Southern-Blot mit embryonaler DNA

(A) Schematische Darstellung des Wildtyp Allels (oben) und des Knock-out Allels (unten) mit HindIII-Schnittstellen und Gensonde (rotes Rechteck). (B) Southern-Blot mit HindIII verdauter embryonaler DNA und hybridisiert mit P^{32} -markierter DNA Sonde.

Neben der genomischen Ebene wurde auch auf RNA Ebene mittels RT-PCR das Rekombinationsereignis überprüft (Abb. 3.4). Die eingesetzte totale RNA wurde aus Embryonen am Tag 9,5 p.c. und 10,5 p.c. isoliert. Pro Genotyp wurden zwei Embryonen verwendet. Die Größe der erhaltenen Amplikons stimmt mit der vorausgesagten Größe überein. Das HCN4 Nullallel ist um das 4. Exon und damit um 218 bp im Gegensatz zum Wildtyp verkürzt. Zusätzlich wurden die amplifizierten Banden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Im Knock-out Amplikon war wie erwartet das 3. Exon auf das 5. Exon gespleist und damit das 4. Exon entfernt. Somit konnte auch auf mRNA Ebene das Rekombinationsereignis bestätigt werden.

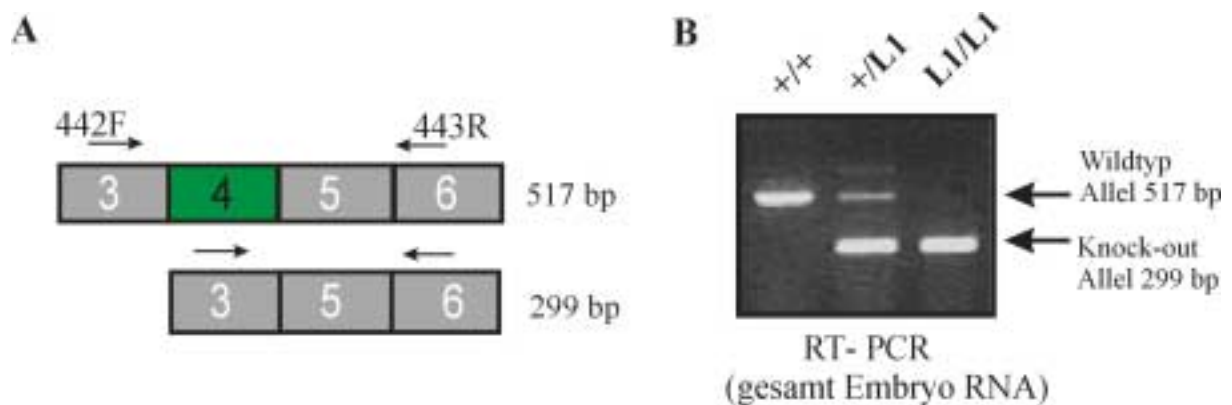


Abbildung 3.4: RT-PCR aus embryonaler RNA

(A) Schematische Darstellung der Exone 3-6 HCN4 cDNA. Wildtyp cDNA (oben), Knock-out cDNA (unten) mit Lage der verwendeten Primer (442F/443R). (B) Ergebnis der RT-PCR, aufgetragen auf 2%iges Agarose Gel.

3.3 Analyse des HCN4 Expressionsmusters in der Embryonalentwicklung

Bis dato lagen über die Rolle von HCN4 in der pränatalen Entwicklung keine Erkenntnisse vor. Um die Ursachen für den letalen Phänotyp aufzuklären, war es daher von großer Bedeutung, das embryonale Expressionsmuster des Ionenkanals zu analysieren. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die ET 9,5 und 10,5 gerichtet.

3.3.1 Analyse der HCN4 mRNA Expression mittels *in-situ* Hybridisierung

Mit der Methode der *in-situ* Hybridisierung ist es möglich, Transkripte direkt auf einem Gewebeschnitt zu detektieren. Eingesetzt wurde eine für HCN4 spezifische RNA-Sonde (Moosmang et al, 2001). Die Untersuchung erfolgte an sagittalen Gewebeschnitten von Wildtyp Embryonen. Es wurden sowohl Embryonen zum Zeitpunkt 9,5 p.c. als auch 10,5 p.c. verwendet (Abb. 3.5).

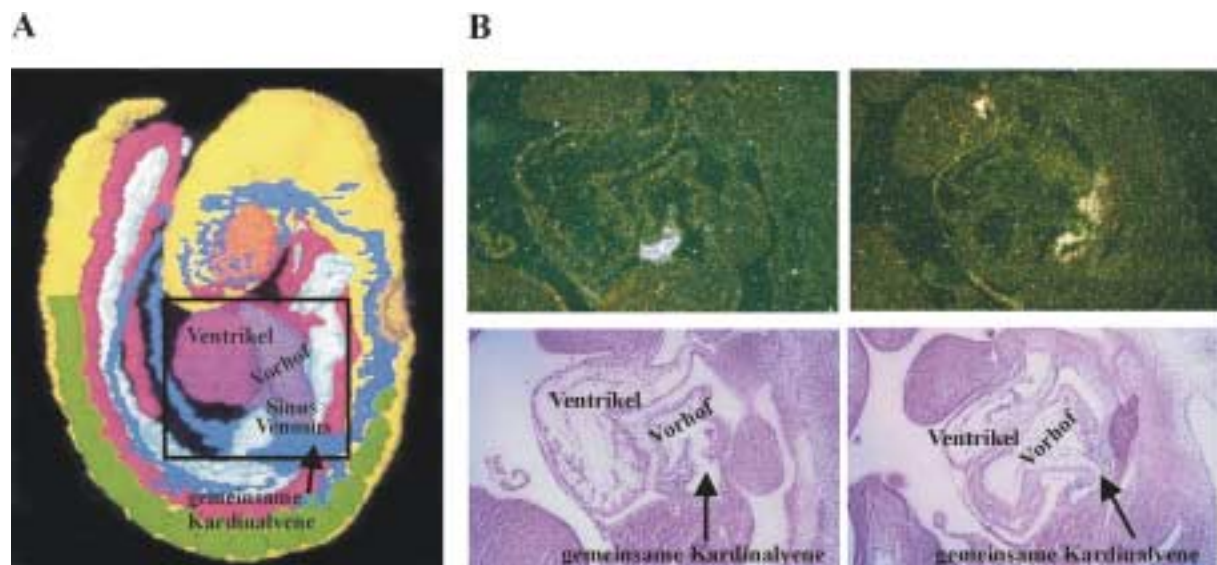


Abbildung 3.5: *In-situ* Hybridisierung mit HCN4 spezifischer RNA-Sonde

(A) Dreidimensionale Rekonstruktion eines Mausembryos ET 9,5 (Kaufman 1999). Das Rechteck umrahmt die Herzanlage. (B) Herzanlage des Embryos im sagittalem Schnitt; (oben): Emulsionsautoradiographie von Schnitten hybridisiert mit ³⁵S-markierter Sonde gegen HCN4; Dunkelfeldaufnahme. (unten): Hellfeldaufnahme der korrespondierenden Schnitte. Die Gewebeschnitte wurden Hämatoxylin / Eosin gefärbt.

Die Abb. 3.5 A zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion eines Mausembryos zum Zeitpunkt 9,5 p.c. (Kaufman 1999) und soll einen anatomischen Überblick über die Bestandteile des frühen kardiovaskulären Systems vermitteln. Ventrikel und Vorhof sind dunkelrot bzw. violett dargestellt. Dunkelblau dargestellt ist die gemeinsame Kardinalvene, die im Sinus venosus mündet. Im Schnitt durch den Embryo (Abb. 3.5 B) zeigt sich ein

starkes und spezifisches HCN4 mRNA Signal in der Herzanlage in der Gegend des Sinus venosus. Eine genaue Analyse der Schnitte zeigte, dass das HCN4 Transkript in der Wand der gemeinsamen Kardinalvene lokalisiert ist, auf der Höhe der Einmündung in den Sinus venosus. Zusätzlich zu dieser starken Expression in der Herzanlage konnte noch ein schwaches Expressionssignal im embryonalen zentralen Nervensystem detektiert werden. Auf Kontroll-Hybridisierungen mit sense-RNA-Sonde wurde kein Signal detektiert.

3.3.2 Untersuchung der HCN mRNA Expression im embryonalen Herzen mittels RT-PCR

Die Ergebnisse der *in-situ* Hybridisierung wurden durch RT-PCR Experimente überprüft. Dazu wurden embryonale Herzen am ET 9,5 und 10,5 isoliert und daraus totale RNA präpariert. Bei diesem Versuchsansatz wurde zusätzlich untersucht, welche anderen HCN-Isoformen im pränatalem Herzen zum Zeitpunkt 9,5 p.c. und 10,5 p.c. exprimiert werden (Abb. 3.6). Die Identität der einzelnen Transkripte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

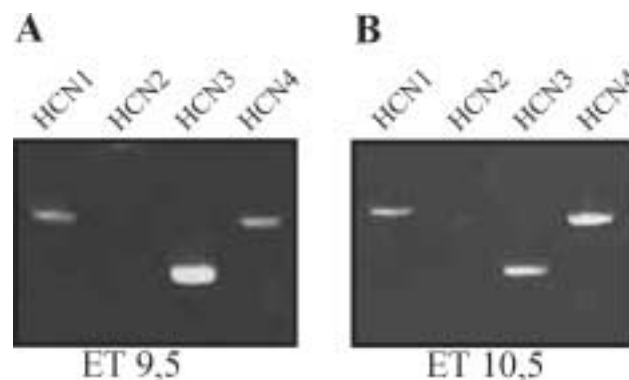


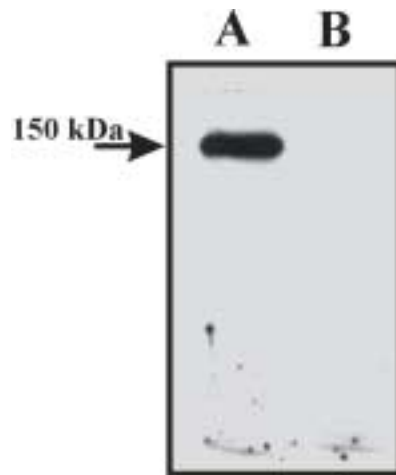
Abbildung 3.6: RT-PCR auf HCN-Isoformen aus embryonalem Herzen

Verwendete Primerkombinationen und resultierende Bandengröße: HCN1 (103F/733R) 531 bp, HCN2 (221F/220R) 517 bp, HCN3 (303F/903R) 404 bp, HCN4 (442F/443R) 517 bp. (A) RT-PCR aus Herz RNA am embryonalen Tag (ET) 9,5. (B) RT-PCR aus Herz RNA am ET 10,5.

Am embryonalen Tag 9,5 kann mit Hilfe der RT-PCR HCN1, 3, und 4, aber nicht HCN2 in der Herzanlage detektiert werden. Erst am darauffolgenden Tag (ET 10,5) kann auch eine leichte, an der Detektionsgrenze liegende HCN2 Bande nachgewiesen werden. Betrachtet man die Expressionsstärke, so fällt auf, dass das HCN3 Signal zwischen den Tagen 9,5 und 10,5 p.c. relativ zu den Subtypen HCN1 und HCN4 an Intensität verliert. HCN4 nimmt dagegen relativ zu den anderen Isoformen zu.

3.3.3 Analyse der HCN4 Proteinexpression

Da Untersuchungen auf Transkriptebeine nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinverteilung erlauben, wurde die Expression von HCN4 auch auf Proteinebene analysiert. Hierfür wurde ein carboxyterminaler HCN4 Peptidantikörper verwendet, der im Rahmen dieser Doktorarbeit aus dem Serum immunisierter Kaninchen aufgereinigt wurde.



Um die Spezifität des Antikörpers zu testen, wurden HEK293 Zellen mit HCN4 cDNA transfiziert. Aus den transfizierten Zellen wurde Membranprotein isoliert und im Western-Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet (Abb. 3.7).

Abbildung 3.7: Western-Blot

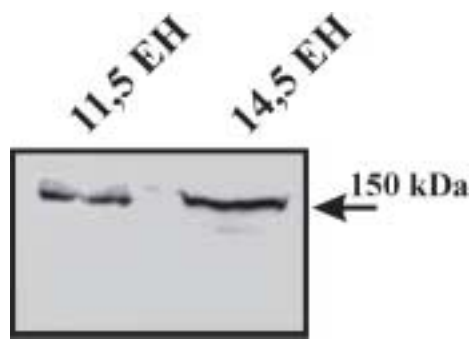
(A), 4 μ g Mikrosomenfraktion aus mit HCN4 cDNA transfizierten HEK293 Zellen. (B), 4 μ g Mikrosomenfraktion aus untransfizierten HEK293 Zellen. Der Blot wurde mit dem HCN4 Antikörper (1:100) inkubiert. Detektion mittels ECL-System. kDa: Kilodalton

Der HCN4 Antikörper erkennt in den transfizierten Zellen eine einzelne HCN4 Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Hier liegt möglicherweise eine glykosilierte Form des Proteins vor, da die Berechnung des Molekulargewichts anhand der cDNA eine Größe von 130 kDa ergibt. Somit ist das scheinbare Molekulargewicht von HCN4 um ca. 20 kDa größer.

Hingegen konnte in den untransfizierten Zellen kein Signal detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen die Spezifität des Antikörpers und rechtfertigen dessen Einsatz in weiteren Experimenten.

3.3.3.1 HCN4 Protein im embryonalen Herzen

Um die HCN4 Expression in der pränatalen Herzanlage auf Proteinebene zu untersuchen, wurde aus embryonalen Wildtyp Herzen Gesamtprotein isoliert und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 3.8).



Der Blot zeigt, dass an den Tagen 11,5 p.c. und 14,5 p.c. im embryonalem Herzen HCN4 Protein detektiert werden kann. Dabei wird auch im nativen Gewebe, wie in den transfizierten HEK 293 Zellen, HCN4 Protein vom primären Antikörper als diskrete Bande mit einer Größe von 150 kDa erkannt.

Abbildung 3.8: Western-Blot Analyse von embryonalen Mausherzen

11,5 EH: 80 µg Gesamtprotein aus embryonalen Herzen am Tag 11,5. 14,5 EH: 100 µg Gesamtprotein aus embryonalen Herzen am Tag 14,5. Primärer HCN4 Antikörper 1:100 verdünnt. Detektion mittels ECL-System. kDa Kilodalton

3.3.3.2 Analyse der HCN4 Proteinexpression mittels Immunhistochemie

Da das prinzipielle Vorkommen von HCN4 Protein im embryonalen Mausherz nachgewiesen worden war, sollte auch das zelluläre Verteilungsmuster von HCN4 auf Proteinebene analysiert werden. Dafür wurden Embryonen am Tag 10,5 p.c. immunhistochemisch untersucht. Um eine präzise Aussage treffen zu können, wo HCN4 genau lokalisiert ist, wurden sowohl sagittale als auch transversale Gewebeschnitte angefertigt (Abb. 3.9).

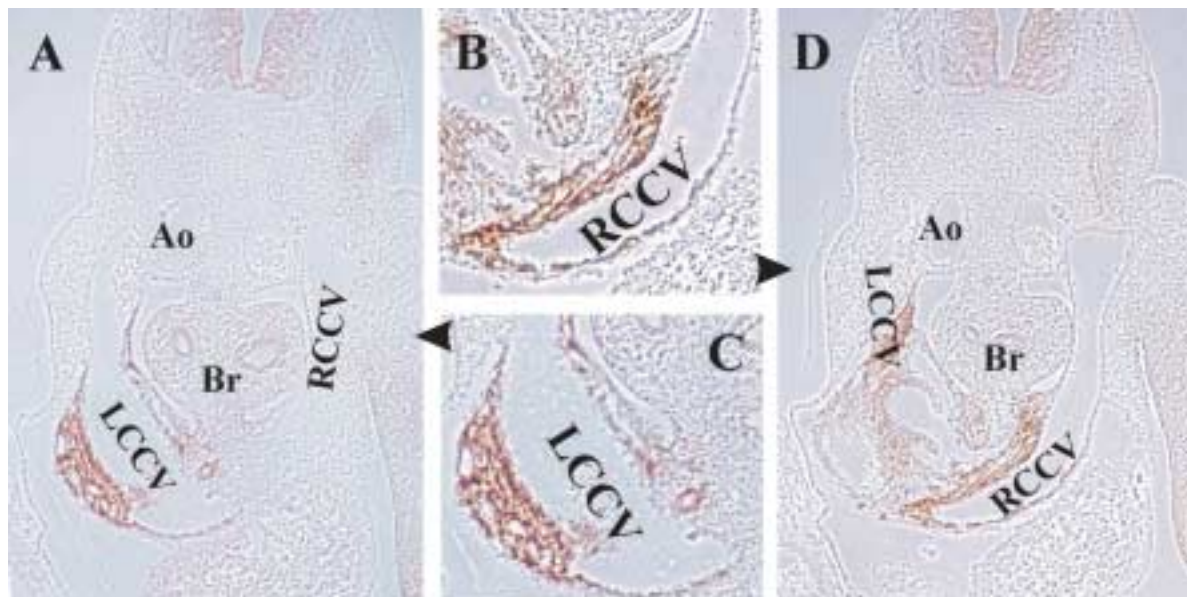


Abbildung 3.9: Expression von HCN4 Protein im Mausembryo 10,5 p.c.

Immunhistochemische Färbung von HCN4 Protein auf transversalen 10 µm dicken Gewebeschnitten. A&D stellen zwei verschiedenen Schnittebenen dar. B&C sind entsprechende Vergrößerungen der HCN4 positiven Bereiche. LCCV: linke gemeinsame Kardinalvene, RCCV: rechte gemeinsame Kardinalvene, Ao: Aorta, Br: Bronchus. HCN4 Antikörper 1:100 verdünnt, Detektion mittels DAB Reagenz.

Nachdem verschiedene Fixierungsmethoden und Nachbehandlungen der Schnitte getestet wurden, wurde ein optimales Signal erst durch Mikrowellenbehandlung der Formaldehyd-fixierten Schnitte erreicht. Auch in der Immunhistochemie zeigt sich damit eine hohe Spezifität des HCN4 Antikörpers. Nur einzelne Gewebekompartimente zeigen eine positive Anfärbung, während das restliche Gewebe nahezu keine Background Färbung erkennen lässt. Auf HCN4-defizienten Embryonen war kein Signal nachzuweisen. Im transversalen Gewebeschnitt ist die gemeinsame Kardinalvene angeschnitten. Je nach Ebene ist einmal ihr linker (3.9 A) sowie auch ihr rechter Ast (3.9 D) zu erkennen. Das HCN4-Kanalprotein ist in der Wand der rechten und der linken Kardinalvene lokalisiert, auf der Höhe der Einmündung in den Sinus venosus. Nach anatomischen Untersuchungen handelt es sich dabei um den Entstehungsort der Vorläuferzellen eines frühen embryonalen Reizleitungssystem (Viragh & Challice, 1980). Es wird angenommen, dass während der kardialen Entwicklung zum Zeitpunkt ET 9,0 sich dort spezialisierte Zellen entwickeln, die später einmal die Schrittmacherzentren des Herzens bilden.

Zusätzlich zu der starken Expression in der Herzanlage konnte noch ein leichtes Signal im embryonalen zentralen Nervensystem detektiert werden.

3.4 Histologische Untersuchung der HCN4-defizienten Embryonen

Nachdem das HCN4 Expressionsmuster während den embryonalen Tagen 9,5 p.c. und 10,5 p.c. offengelegt worden war, sollte der HCN4 Knock-out auf Fehlentwicklungen während der Embryogenese untersucht werden. Dabei war, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Expression von HCN4, insbesondere die Herzanlage von großem Interesse. Zu diesem Zweck wurden am Tag 9,5 p.c. sowohl vom Wildtyp als auch vom Knock-out Mausembryo sagittale Gewebeschnitte angefertigt, diese anschließend Hämatoxylin / Eosin gefärbt und miteinander verglichen (Abb. 3.10).

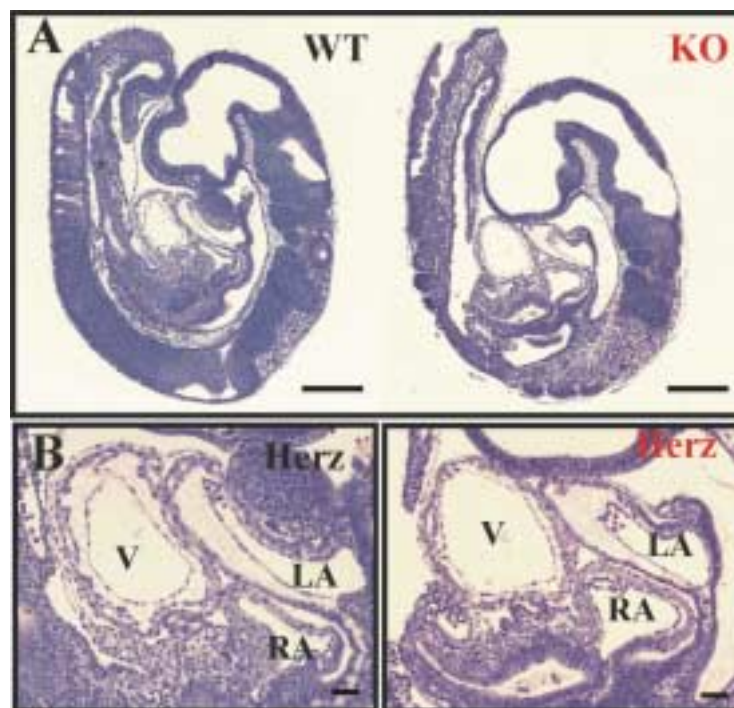


Abbildung 3.10: Histologische Untersuchung von Wildtyp und Knock-out Embryonen

Hämatoxylin / Eosin angefärbter sagittaler Schnitt durch einen Mausembryo am Tage 9,5 p.c.. (A) links: HCN4^{+/+}-Embryo (WT), rechts: HCN4^{-/-}- Embryo (KO). (B) Vergrößerte Aufnahme der Herzanlage von Wildtyp Embryo (links) und von Knock-out Embryo (rechts); V: Ventrikel, RA: rechter Vorhof, LA: linker Vorhof. Maßstab (A) 500 μ m; (B) 100 μ m

Die histologische Untersuchung zeigte keine Auffälligkeiten in der Morphologie der HCN4-defizienten Embryonen. Auch in der Herzanlage konnten keine offensichtlichen Defekte erkannt werden. Vorhöfe und Ventrikel scheinen beim Knock-out normal entwickelt.

3.5 Funktionelle Analyse der HCN4-defizienten Embryonen

Da ein grundsätzlicher Entwicklungsdefekt als mögliche Ursache für den Tod der Knock-out Tiere nicht vorliegt, wurden die Embryonen auf funktionelle Besonderheiten hin analysiert. Dabei standen die kardialen Eigenschaften im Fokus der Analyse.

3.5.1 Physiologische Untersuchung der embryonalen Herzfrequenz

Um die embryonale Herzfrequenz möglichst unabhängig von zentral gesteuerten Einflüssen zu erfassen, wurden die Herzen der 9,5 Tage alten Embryonen vom restlichen Gewebe abgetrennt. Die Messung der Kontraktionen erfolgte dann 24 Stunden nach der Präparation an den isolierten embryonalen Herzen. Neben der Frequenz wurde auch die β -adrenerge Frequenzmodulation mittels cAMP untersucht (Abb. 3.11).

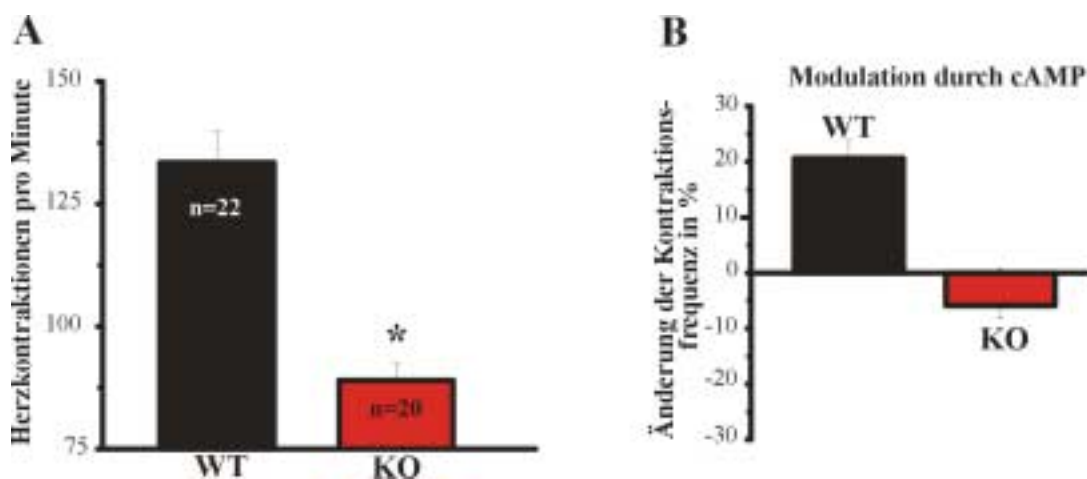


Abbildung 3.11: Herzfrequenz von isolierten embryonalem Herzen, ET 9,5

(A) Kontraktionen pro Minute von HCN4^{+/+}-WT und HCN4^{-/-}-KO Herzen. (B) Prozentuale Änderung der Herzfrequenz durch cAMP. WT: Wildtyp (HCN4^{+/+}), KO: Knock-out (HCN4^{-/-}), n: Anzahl der gemessenen Herzen. * $p < 0,001$.

Die isolierten embryonalen Herzen aus Wildtyp wie auch aus Knock-out Tieren kontrahierten regelmäßig und zeigten keine offensichtlichen Arrhythmien. Die Wildtypherzen schlugen mit einer Frequenz von ~ 140 pro Minute ($139 \pm 22 \text{ min}^{-1}$), während die Knock-out Herzen eine signifikant langsamere Frequenz aufwiesen. Die HCN4-defizienten Herzen kontrahierten mit $88 \pm 14 \text{ min}^{-1}$. Damit ist die basale Frequenz der Knock-out Herzen um rund ein Drittel gegenüber dem Wildtyp verlangsamt (Abb. 3.11, A).

Die Herzfrequenz wird im adulten Sinusknoten, dem primären Schrittmacherzentrum, durch cAMP stimuliert. Man vermutet, dass diese Stimulation zumindest teilweise durch den I_h -

Strom vermittelt wird, dem die HCN-Kanäle zugrunde liegen. Dabei stimuliert cAMP direkt über eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide die HCN-Kanäle und soll auf diese Weise die Herzfrequenz beeinflussen. Die Messung an isolierten embryonalen Herzen zeigte, dass durch die Gabe von cAMP die Wildtypfrequenz gesteigert werden konnte. Der Zusatz von cAMP (10^{-4} M 8-Br-cAMP) zur Badlösung bewirkte (nach 8 Minuten) eine Kontraktionszunahme um 20%, von 139 Schlägen pro Minute auf 166 pro Minute. Dagegen konnte bei den Knock-out Herzen die Frequenz durch cAMP nicht gesteigert werden. Überraschenderweise reagierten diese nach anhaltender cAMP Exposition (über 10 Minuten) sogar mit einer Frequenzverlangsamung um 5 bis 15%.

3.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen an embryonalen Kardiomyozyten

Die elektrophysiologischen Experimente fanden an isolierten embryonalen Kardiomyozyten statt. Hierfür wurden die Herzen zu den Tagen 8,0 p.c., 8,5 p.c., 9,5 p.c. und 10,5 p.c. isoliert und enzymatisch verdaut. An den kontrahierenden Zellen wurde sowohl der I_h -Strom gemessen als auch spontane Aktionspotentiale abgeleitet.

3.5.2.1 HCN4-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine signifikante Reduktion im I_h -Strom

Der I_h -Strom wurde mittels "whole cell patch clamp" Aufnahmen analysiert. Die Wildtypzellen wiesen einen deutlichen I_h -Strom auf. Bei einem hyperpolarisierenden Puls von -140 mV betrug die maximale Stromdichte am Tag 9,5 p.c. 22,4 pA/pF und am Tag 10,5 p.c. 19,8 pA/pF. Dagegen konnte bei den Knock-out Zellen nur ein kleiner I_h -Strom an den entsprechenden Tagen registriert werden. Dieser war am Tag 9,5 p.c. 4,1 pA/pF und am Tag 10,5 p.c. 4,9 pA/pF groß. Somit lag, im Vergleich zum Wildtyp, in den HCN4-defizienten Kardiomyozyten ein um ca. 75-85% reduzierter I_h -Strom vor (Abb. 3.12).

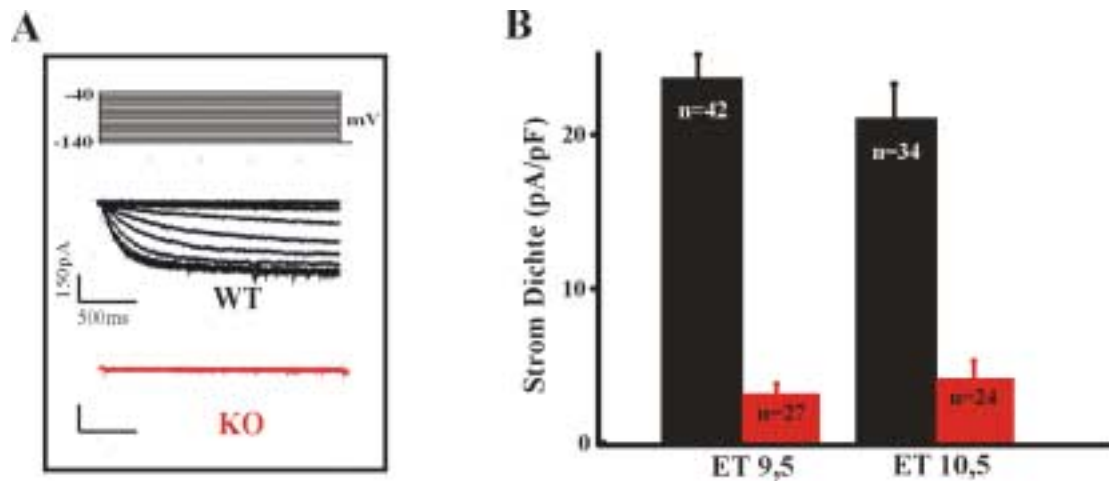


Abbildung 3.12: I_h-Messung an isolierten Kardiomyozyten

(A) I_h Spuren von HCN4^{+/+} (schwarz) und HCN4^{-/-} (rot) Kardiomyozyten am ET 9,5. Stromamplitude und Zeiteichung ist bei beiden dieselbe. Über den Stromspuren: Puls Protokoll. (B) I_h-Stromdichte von HCN4^{+/+} (schwarze Balken) und HCN4^{-/-} (rote Balken) am ET 9,5 und 10,5. n: Anzahl der gemessenen Zellen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der I_h-Strom in embryonalen Kardiomyozyten zum größten Teil durch HCN4 vermittelt wird.

Zusätzliche Messungen an den embryonalen Tagen 8,5 und 9,0 ergaben eine entwicklungsabhängige Zunahme in der Stromdichte. I_h nimmt hierbei in den Wildtypzellen zwischen den ET 8,5 bis zum ET 9,5 stetig und signifikant zu. Dabei ändert sich die Stromdichte von 7,5 pA/pF am ET 8,5 (n=15) auf schließlich 22,4 pA/pF am ET 9,5 (n=42). Bis zum Tag 10,5 konnte keine weitere Stromdichtenzunahme mehr beobachtet werden. In den Knock-out Kardiomyozyten konnte diese entwicklungsabhängige Zunahme ebenfalls beobachtet werden. Hierbei erhöhte sich die I_h Stromdichte von 0,8 pA/pF (ET 8,5; n=14) auf 4,9 pA/pF (ET 10,5; n=24).

3.5.2.2 In HCN4^{-/-}-Kardiomyozyten ist kein sinusknotenähnliches Aktionspotential zu detektieren

Dem I_h-Strom wird im adulten Sinusknoten bei der Generierung von spontanen Aktionspotentialen eine wichtige Rolle zugesprochen. Daher war es von Interesse auch im Embryo Aktionspotentiale an isolierten Kardiomyozyten zu messen und mit denen von HCN4-defizienten Zellen zu vergleichen. Die aufgezeichneten Aktionspotentiale ließen sich in vier verschiedene Typen einteilen, die elektrophysiologisch eindeutig voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 3.13 oben). Drei dieser Typen traten sowohl beim Wildtyp als auch beim Knock-out auf. Dabei handelte es sich um sogenannte primitive, vorhofähnliche (oder "intermediate") und ventrikelähnliche AP. Die primitiven AP waren im frühen

embryonalen Herzen (ET 8,0 bis 8,5) in fast allen untersuchten Kardiomyozyten zu finden. Untersuchungen in späteren Entwicklungsstadien (ET 9,5 bis 10,5) zeigten, dass in den HCN4^{-/-}-Zellen deutlich mehr Kardiomyozyten vorhanden waren die diese "primitive" AP-Form generieren, als in den HCN4^{+/+}-Präparationen. Am ET 10,5 besaßen 16% der Knock-out Zellen und nur 5% der Wildtyp Zellen diesen Typ AP (Abb. 3.13 unten). Dagegen konnte in der relativen Häufigkeit der vorhofähnlichen und ventrikelähnlichen AP keine Unterschiede zwischen Knock-out und Wildtyp registriert werden.

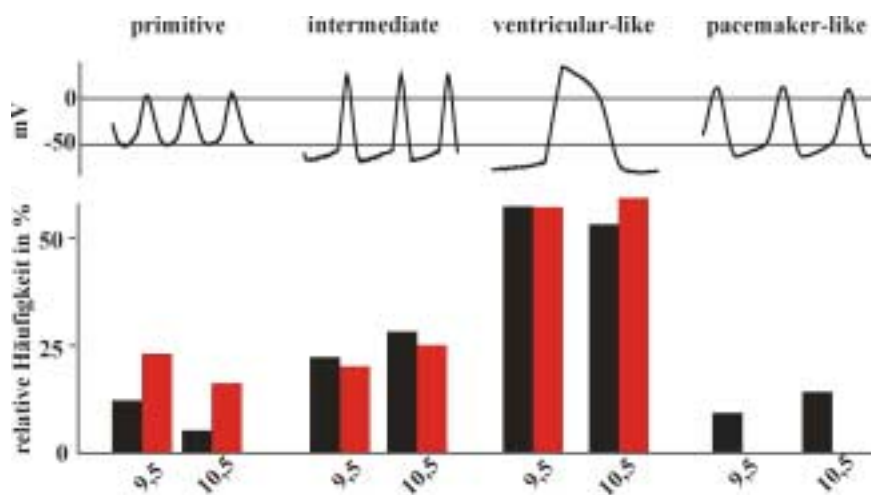


Abbildung 3.13: Aktionspotentiale in isolierten Kardiomyozyten

(oben) Verschiedene Typen von Aktionspotentialen aus isolierten Wildtyp Kardiomyozyten am ET 9,5. (unten) Relative Häufigkeit der darüber gezeigten Aktionspotentialtypen während den ET 9,5 und 10,5; Isoliert aus HCN4^{+/+}-Herzen (schwarze Balken) und HCN4^{-/-}-Herzen (rote Balken). Anzahl der untersuchten Zellen: HCN4^{+/+}/HCN4^{-/-} = 101/60 (ET 9,5); 64/79 (ET 10,5).

Beim vierten Aktionspotentialtyp, der in Wildtyp Präparationen ab ET 9,0 entdeckt werden konnte, handelt es sich um ein schrittmacherähnliches (*pacemaker-like*) AP. Dieses AP ist dem Schrittmacher-Potential in adulten Sinusknotenzellen sehr ähnlich, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei diesen Zellen um Zellen des frühen embryonalen Reizleitungssystems handelt. Dieses "reife" Schrittmacherpotential konnte am ET 10,5 in 14% der HCN4^{+/+}-Kardiomyozyten detektiert werden. Diese Häufigkeit ist im Einklang mit den Expressionsanalysen aus der *in-situ* Hybridisierung und Immunhistochemie, die ein Vorkommen von HCN4 in etwa 10% aller Herzzellen aufzeigen.

Im großen Gegensatz zum Wildtyp konnte in keiner Knock-out Präparation (ET 8,5-10,5, n=192 Zellen) auch nur eine einzige Zelle gefunden werden, die dieses "reife" Schrittmacherpotential besitzt.

Zusätzlich zu den AP-Aufzeichnungen wurde auch deren Stimulierbarkeit via cAMP getestet (ET 10,5). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von 10⁻⁴ M 8-Br-cAMP zur

Badlösung die Frequenz der schrittmacherähnlichen Potentiale um ca. 20% erhöht wird. Dies entspricht etwa der Frequenzsteigerung, die auch in den embryonalen Wildtyp Herzen festgestellt wurde (Abb. 3.11 B). Dagegen konnten die primitiven, vorhofähnlichen und ventrikelähnlichen AP Frequenzen weder bei HCN4^{+/+}- noch bei HCN4^{-/-}-Zellen durch cAMP gesteigert werden. Bei diesen bewirkte die cAMP Zugabe, ähnlich wie in den isolierten Knock-out Herzen zuvor (Abb. 3.11 B) eine Frequenzverringerung um etwa 5-15%. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass in den Knock-out Herzen keine "reifen", durch cAMP regulierbaren Schrittmacherzellen vorhanden sind.

3.6 Generierung eines herzspezifischen HCN4-defizienten Mausembryos

In den Expressionsuntersuchungen von HCN4 Transkript und Protein wurde auch ein schwaches Signal im ZNS detektiert (Abb. 3.5 & 3.9). Um deshalb sicher zu stellen, dass die ubiquitär HCN4-defizienten Tiere in der Tat aufgrund der Deletion im Herzen zwischen dem ET 10,0 und ET 11,5 sterben, wurde ein herzspezifischer Knock-out erzeugt. Hierfür wurde die transgene Mauslinie MLC2a Cre verwendet. Bei dieser Mauslinie (Kenneth R. Chien et al, University of California) wird die Cre Rekombinase unter Kontrolle des herzspezifischen *atrial myosin light chain*-Promotors Zelltyp-spezifisch exprimiert. Dadurch wird dann nur in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten das *loxP* flankierte DNA Segment durch Cre-vermittelter Exzision effektiv entfernt (Wettschureck et al, 2001; Ludwig et al, 2003).

3.6.1 Charakterisierung der MLC2a Cre-Aktivität während der Embryogenese

Für unsere Zwecke war es entscheidend sicher zu stellen, dass die Cre Rekombinase schon während der Embryonalentwicklung vor dem Zeitpunkt 9,5 p.c. herzspezifisch exprimiert wird. Um dies zu untersuchen, wurde in die MLC2a Cre-Linie eine lacZ-Reporterlinie (ACZL, Akagi et al, 1997) eingekreuzt und die Rekombination in ET 9,5 Embryonen mittels einer chromogenen Nachweismethode erfasst.

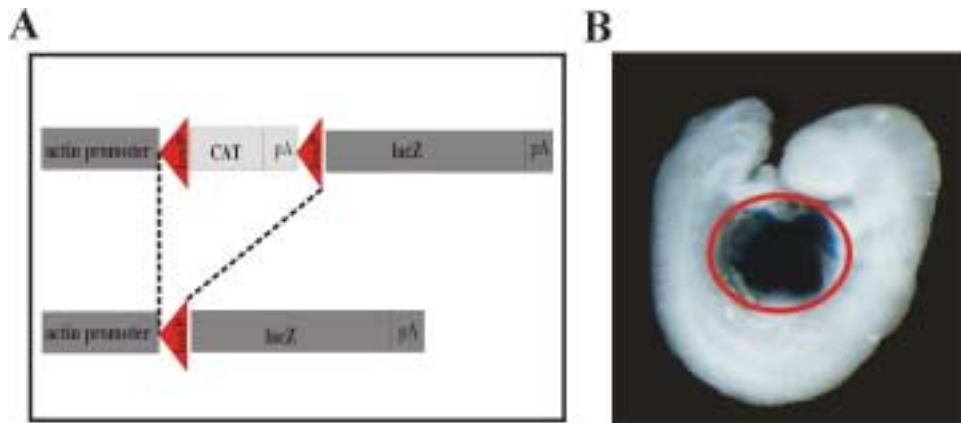


Abbildung 3.14: Nachweis der Cre-Aktivität durch lacZ Färbung

(A) Schematische Darstellung der Cre-vermittelten Exzision der geflochten CAT (chloramphenicol acetyl transferase) Stop-Sequenz. (B) MLC2aCre^{+/+}, ACZL^{+/+} -Embryo am ET 9,5, mit rot umrandeter lacZ positiv gefärbter Herzanlage

In der ACZL-Reporterlinie steht das lacZ Gen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven "chicken β actin" Promotors (Abb. 3.14 A). Vor dem offenen Leserahmen des lacZ Gens ist eine durch *loxP* Sequenzen flankierte Stop-Sequenz, das Chloramphenicol-acetyl-transferase (CAT) Gen, eingefügt. Wird nun durch Cre-vermittelte Exzision die Stop-Sequenz entfernt, so kann die exprimierte β -Galaktosidase mittels chromogener Substanzen, wie X-Gal, im Gewebe nachgewiesen werden.

Die lacZ Färbung von ET 9,5 Embryonen zeigt ein stark positives Signal spezifisch in der embryonalen Herzanlage (Abb. 3.14 B). Dies deutet darauf hin, dass zu diesem frühen Zeitpunkt die Cre Rekombinase herzspezifisch exprimiert wird. Die MLC2a Cre-Linie stellt also für unsere Zwecke ein geeignetes Instrument dar.

3.6.2 Die herzspezifischen HCN4^{-/-}-Embryonen sterben während der selben Entwicklungsphase wie die global HCN4-defizienten Tiere

Um herzspezifische HCN4-defiziente Tiere zu erzeugen wurden heterozygote Nullmutanten (HCN4^{+/^{L1}}) mit MLC2a Cre-Mäusen verpaart. Der aus dieser Verkreuzung hervorgegangene Genotyp (HCN4^{+/^{L1}} / MLC2a Cre) wurde mit HCN4^{L2/L2} Tieren zusammengesetzt. Die daraus resultierenden konditionalen Knock-out Mäuse (HCN4^{L2/L1} / MLC2a Cre) exprimieren die Cre Rekombinase Promotor-kontrolliert. Dadurch werden alle Zellen, in welchen das Cre Enzym aktiv ist, zu Knock-out (HCN4^{L1/L1}) Zellen (siehe auch 2.4.4).

Um den Zusammenhang zwischen der Deletion im Herzen und dem letalen Phänotyp der ubiquitären HCN4-defizienten Embryonen zu bestätigen, wurden die herzspezifischen Knock-out Tiere an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung auf Vitalität hin untersucht.

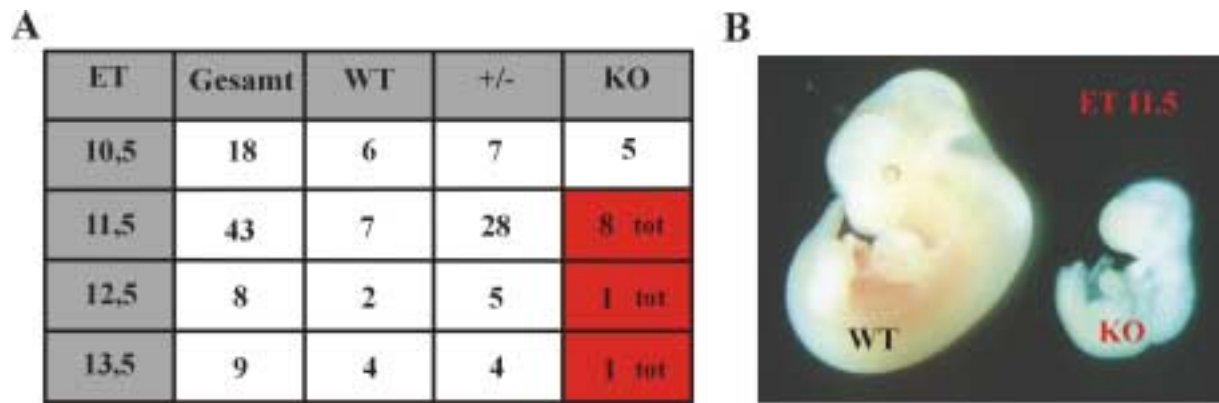


Abbildung 3.15: Herzspezifische Deletion von HCN4 führt zur gleichen embryonalen Letalität wie globale Deletion

(A) Embryonale Vitalität an verschiedenen Tagen der Entwicklung. Die Wildtyp-Kontrolle (WT) entspricht dem $HCN4^{L2/+}$ Genotyp, die Heterozygot-Kontrolle (+/-) entspricht dem $HCN4^{L2/+};MLC2aCre^{tg/+}$ und dem $HCN4^{L2/L1}$ Genotyp, die herzspezifischen Knock-out (KO) entspricht dem $HCN4^{L2/L1};MLC2aCre^{tg/+}$ Genotyp. Angegeben ist die Zahl der untersuchten Embryonen. (B) Isolierte Embryonen am ET 11,5.

Am ET 10,5 waren die herzspezifischen Mutanten äußerlich nicht von ihren Geschwistern zu unterscheiden. Hingegen zeigten die Untersuchungen am ET 11,5, dass zu diesem Zeitpunkt, genau wie bei den total Knock-outs (siehe Tabelle 3.1), keine lebenden Embryonen mit der spezifischen HCN4 Deletion im Herzen vorhanden waren. Wie Abb. 3.15 B zeigt, kann man zu diesem Zeitpunkt die konditionalen Knock-out Tiere klar von den Kontrolltieren unterscheiden. Zu späteren Zeitpunkten war dann nur noch stark resorbiertes Knock-out Gewebe nachzuweisen.

Somit zeigen die herzspezifischen HCN4-defizienten Tiere den gleichen embryonal letalen Phänotyp wie die ubiquitären Knock-outs. Dieses Ergebnis spricht stark dafür, dass die HCN4-defizienten Tiere tatsächlich aufgrund der HCN4 Deletion im Herzen *in-utero* sterben.

3.7 Expressionsmuster von HCN4 im kardialen Reizleitungssystem der adulten Maus

Das Verteilungsmuster der HCN-Kanäle im Herz des erwachsenen Tieres wurde bereits auf RNA Ebene mittels *in-situ* Hybridisierung untersucht (Moosmang et al, 2001). Hierbei zeigte sich eine starke Expression von HCN4 mRNA im Sinusknoten, während im Vorhof und Ventrikel nur wenig Transkript detektiert werden konnte. Die anderen HCN Subtypen zeigten keine oder nur geringe Anreicherungen von hybridisiertem Transkript im Sinusknoten.

Dieses auffällige HCN4 Expressionsmuster im kardialen Reizleitungssystem sollte nun mittels Western-Blot Analyse und immunhistochemischen Methoden auf der funktionell entscheidenden Proteinebene analysiert werden.

3.7.1 Nachweis von HCN4-Kanälen im Sinusknoten der Maus mittels Western-Blot Analyse

Der murine Sinusknoten ist ein etwa 1 mm² großes heterogenes Gewebe, welches von der Sinusknotenarterie durchzogen wird. Anatomisch gesehen befindet er sich auf Höhe der Einmündung der Vena cava superior in den rechten Vorhof (Abb. 3.16 A).

Bei der Dissektion wurde darauf geachtet, den Sinusknoten möglichst eng heraus zu schneiden. Das Gewebe wurde anschließend eingefroren, pulverisiert und in SDS gelöst. Dieser Gesamtproteinextrakt wurde dann in die Western-Blot Analyse eingesetzt (Abb. 3.16 B Spur 2). Als Größenvergleich diente das in HEK293 Zellen produzierte rekombinante HCN4 Protein (Spur 1).

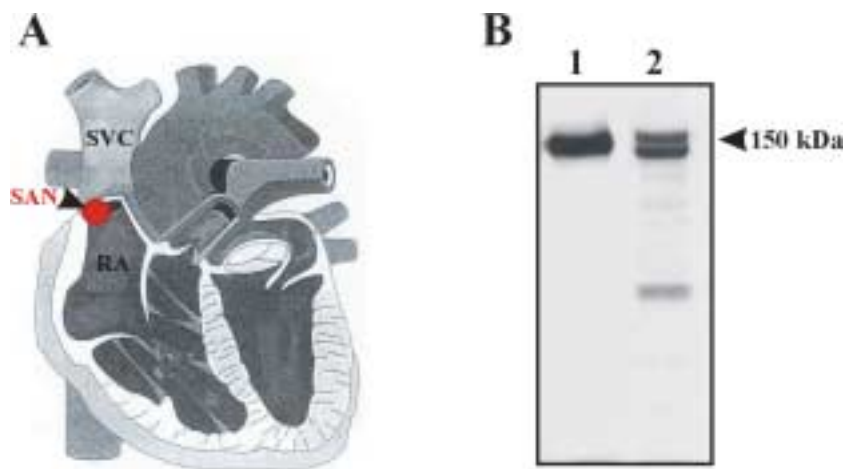


Abbildung 3.16: HCN4 Protein im Sinusknoten der Maus

(A) Schematische Darstellung eines Säuger-Herzens. SVC: Vena cava superior; RA: rechter Vorhof; SAN: Sinusknoten. (B) Western-Blot mit HCN4 Antikörper inkubiert (1:100). (1), 4 µg Mikrosomenfraktion aus HCN4 transfizierten HEK293 Zellen. (2), 35 µg Sinusknotenproteinextrakt. Detektion mittels ECL-System. kDa: Kilodalton

Der HCN4 Antikörper zeigt ein deutliches Signal im Sinusknoten (Spur 2). Dabei erkennt er eine ca. 150 kDa schwere und zusätzlich eine um ca. 15 kDa leichtere Bande. Es handelt sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um die glykosylierte und nicht-glykosylierte Form des Kanals.

3.7.2 Analyse der HCN4 Expression im Sinusknoten mittels Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurde, beginnend von der oberen Hohlvene bis in den rechten Vorhof, 10 µm dicke Schnittserien von adulten Mauserherzen angefertigt. Als Orientierungshilfe für die Identifizierung des Sinusknotens dienen die Sinusknotenarterie und die besonders dicht gepackte Zellstruktur des primären Erregungsbildungszentrums.

Der HCN4 Antikörper zeigt eine starke und äußerst selektive HCN4 Expression im ganzen Sinusknoten (Abb. 3.17). Nur das dicht gepackte Sinusknotengewebe zeigt ein positives HCN4 Signal, während die gesamte Wand der Vena cava superior nicht gefärbt ist. Deutlich ist auch die Sinusknotenarterie zu erkennen, die sich durch ihre nicht gefärbte Gefäßwand vom umgebenden Gewebe abhebt.

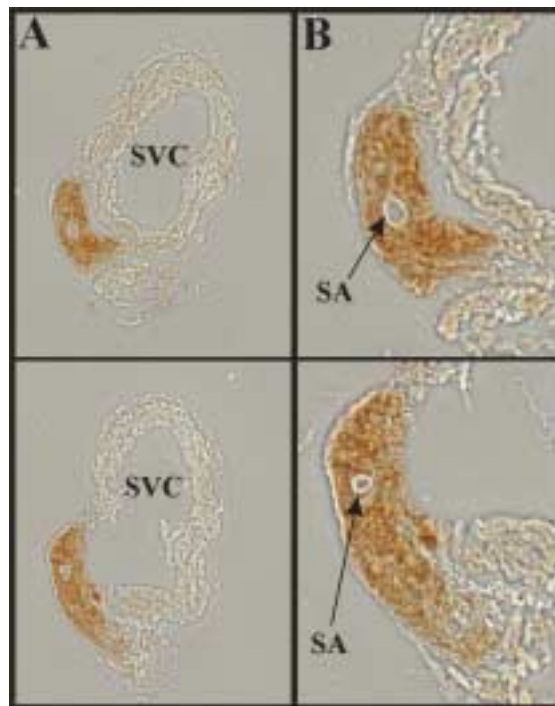


Abbildung 3.17: Immunhistochemische HCN4 Färbung im Sinusknoten der Maus

(A) Aufeinanderfolgende Schnittebenen durch den Sinusknoten am Übergang der Vena cava superior (SVC) in den rechten Vorhof. (B) Vergrößerung des Sinusknotens mit durchziehender Sinusknotenarterie (SA). HCN4 Antikörper 1:100 verdünnt. Detektion mittels DAB Reagenz

Die immunhistochemischen Untersuchungen demonstrieren, dass HCN4 einen spezifischen Sinusknotenmarker darstellt.

3.7.3 Nachweis von HCN4-Kanälen in einzelnen, isolierten Sinusknotenzellen

Der Sinusknoten stellt ein heterogenes Gewebe dar. In seinem Zentrum liegen andere elektrophysiologische Eigenschaften vor als in seiner Peripherie. Das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Ionenkanäle und der Einfluss des hyperpolarisierten atrialen Myokards verursachen diese Heterogenität. Auch in der Zellgröße und Zellform unterscheiden sich die Zellen des Sinusknotens. Anhand der Morphologie kann man zwei verschiedene Zelltypen unterscheiden, Spindel- und Spiderzellen (Wu et al, 2000).

Um die Frage zu klären, ob HCN4 in allen Sinusknoten-Zelltypen zu detektieren ist, wurde die Sinusknotenregion verdaut und die einzelnen isolierten Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert.

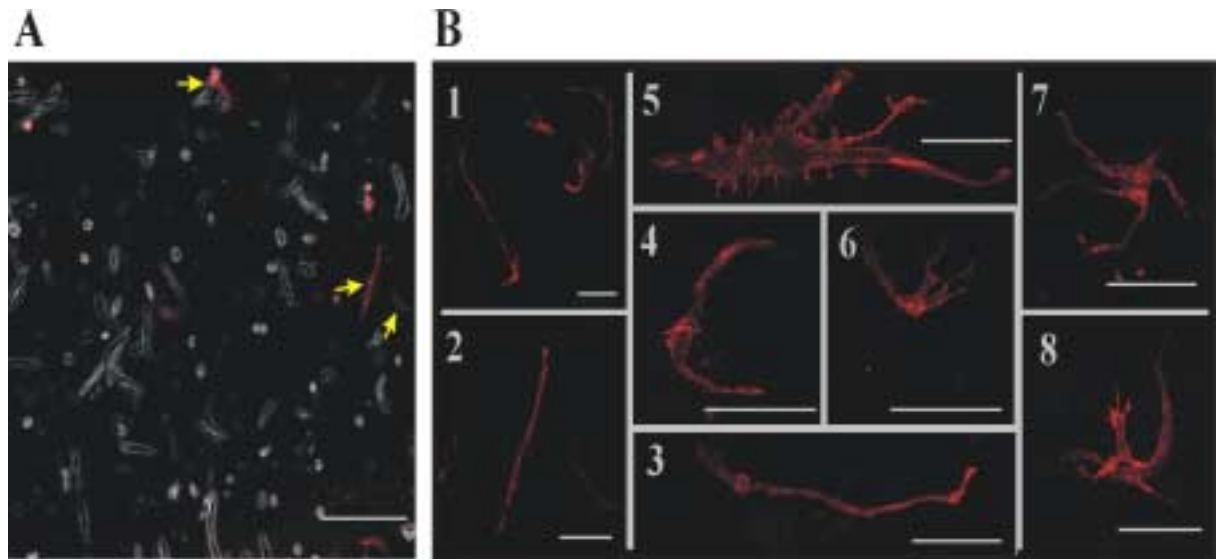


Abbildung 3.18: HCN4 Protein in isolierten Sinusknotenzellen

Konfokale Laser-Scan Mikroskopie. Primärer HCN4 Antikörper (1:100); Sekundärer anti-Kaninchen Cy3 Markierter Antikörper. (A) Übersichtsbild mit einzelnen HCN4 positiven Sinusknotenzellen (gelbe Pfeile). Maßstab: 200 μ m. LSM-Aufnahme mit Durchlicht im Phasenkontrast. (B) Einzelne HCN4 positive Sinusknotenzellen. Bild 1-4: Spindelzellen. Bild 5-8: Spiderzellen. Maßstab: 50 μ m

Die aus der Sinusknotenregion isolierten Zellen wiesen unterschiedliche morphologische Eigenschaften auf. Bei den meisten Zellen handelte es sich um atriale Myozyten. Nur etwa 10% der vorhandenen Zellen waren Sinusknotenzellen, die durch ihre unregelmäßige Form und dem Mangel an Myofilament identifiziert werden konnten.

In der konfokalen Laser-Scan Mikroskopie erkennt man, dass wenige Zellen HCN4 positiv sind (Abb. 3.18 A), wobei diese aber alle aufgrund ihrer äußerlichen Charakteristika zu Sinusknotenzellen gezählt werden können. Der restliche überwiegende Teil der Präparation zeigt keine Fluoreszenz. Unter den HCN4 positiven Zellen sind Spindel- wie auch

Spiderzellen (Abb. 3.18 B). Die Spindelzellen (B 1-4) zeigen typische Charakteristika: eine langgestreckte Form mit spitzzulaufenden Enden, sie sind oft gekrümmt und weisen, wenn überhaupt, nur eine leichte Streifung auf. Die Spiderzellen (B 5-8) hingegen besitzen mehrere, im Durchschnitt vier vom Kern ausgehende "Arme", die sich dann noch weiter verästeln (Wu et al, 2000).

Die Ergebnisse aus der konfokalen Laser-Scan Mikroskopie zeigen, dass HCN4 ausschließlich in Sinusknotenzellen zu detektieren ist, wobei sowohl die Spindel- als auch Spiderzelltypen den Kanal exprimieren.

3.7.4 Nachweis von HCN4 im AV-Knoten und den Herzklappen

Aufgrund der auffallend starken und spezifischen HCN4 Expression im Sinusknoten sollten noch andere Teile des kardialen Reizleitungssystems untersucht werden. Von besonderem Interesse war die Expressionsanalyse des sekundären Erregungsbildungszentrum, des Atrioventrikularknoten (AV-Knoten).

Anatomisch liegt der AV-Knoten im Bereich der Klappenebene im Vorhofseptum. Er kann als "Sammelstelle der Vorhoferregung" bezeichnet werden und kontrolliert die Geschwindigkeit der Überleitung der Erregung von den Vorhöfen zu den Herzkammern.

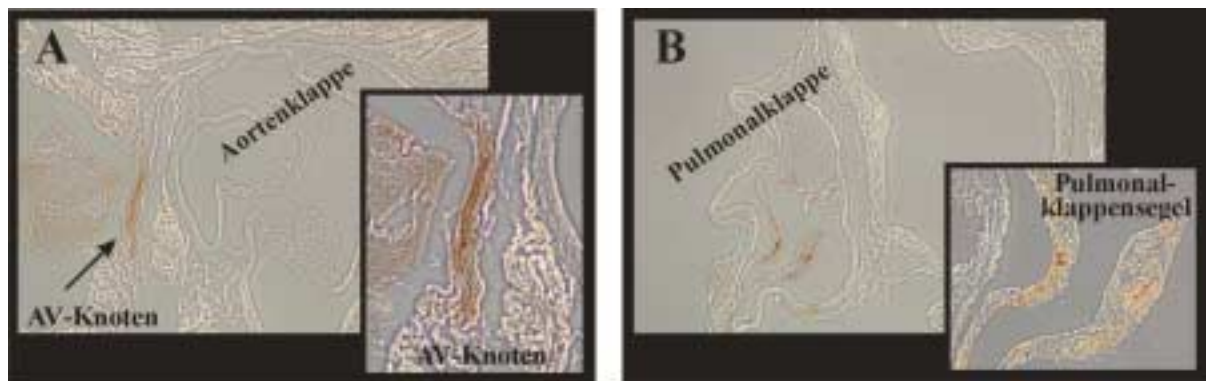


Abbildung 3.19: HCN4 im AV Knoten und in den Herzklappen

Immunhistochemische HCN4 Anfärbung im 10 µm dicken Gewebeschnitt. (A) Schnittebene durch den AV-Knoten. Das Inset zeigt den positiv gefärbten AV-Knoten vergrößert. (B) Schnittebene unterhalb des AV-Knoten, durch die Pulmonalklappe. Das Inset zeigt die positiv angefärbten Herzklappen vergrößert. HCN4 Antikörper 1:100 verdünnt, Detektion mittels DAB Reagenz.

Um den AV-Knoten darzustellen, wurden Schnitte durch die Klappenebene gelegt (Abb. 3.19 A). Der HCN4 Antikörper zeigt eine spezifische Färbung in der unteren Vorhofscheidewand, wobei es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um den AV-Knoten handelt. Diese Daten werden durch elektrophysiologische Untersuchungen am Kaninchen AV-Knoten untermauert.

Bei diesen Messungen ist in fast allen AV-Zellen ein ausgeprägter I_h -Strom und eine prominente Phase 4 Depolarisation zu beobachten (Munk et al 1996).

Neben der Expression im AV-Knoten zeigte sich noch auf den Herzklappen der Pulmonalarterie ein positives HCN4 Signal (Abb. 3.19 B). Ein weiteres Vorkommen von HCN4 Protein in anderen Herzgeweben konnte nicht nachgewiesen werden.

3.8 Deletion von HCN4 im Sinusknoten adulter Mäuse

Die bisher beschriebenen HCN4-defizienten Tiere sind nicht lebensfähig und sterben noch während der Embryonalentwicklung im Mutterleib ab. Deshalb kann die Rolle des Ionenkanals in erwachsenen Tieren mit diesen Mäusen nicht untersucht werden. Ein entscheidender Vorteil des Cre *loxP* Systems liegt nun aber in der Möglichkeit, durch Verwendung geeigneter Cre-Linien Ort und Zeitpunkt der Gendeletion (jedenfalls im Prinzip) frei wählen zu können.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde weiterhin klar gezeigt, dass in den Zellen des Sinusknotens sehr stark HCN4 Protein exprimiert wird. Deshalb sollten nun adulte Mäuse erzeugt werden, denen im Sinusknoten HCN4 fehlt. Mit diesen Tieren sollte es möglich sein, die umstrittene Rolle von HCN4 bei der kardialen Erregungsbildung zu klären.

3.9 Charakterisierung von geeigneten Cre-Mauslinien

Die Generierung einer im Sinusknoten HCN4-defizienten adulten Maus sollte durch die Einkreuzung geeigneter Cre-Linien erfolgen. Anforderungen an diese Mauslinien waren: (i) effiziente Cre-vermittelte Exzision im Sinusknoten, und (ii) zeitlich kontrollierte Rekombination, um die embryonale Letalität zu umgehen.

Deshalb wurden verschiedene, potentiell geeignet erscheinende Cre-Linien bezogen (Tab. 3.2) und auf ihre Brauchbarkeit überprüft. Allerdings war bei diesen Linien die Rekombination im Herz teilweise überhaupt nicht oder nur unzureichend untersucht worden. Bei keiner Linie war die Rekombinationseffizienz im Reizleitungssystem analysiert worden.

Die einzelnen Cre-Linien wurden deshalb durch Einkreuzung einer Reportermauslinie (ACZL) und anschließender lacZ Färbung näher charakterisiert. Die Cre-vermittelte Exzision im Sinusknotenbereich wurde dabei besonders analysiert.

Cre-Maus	Promotor für Cre	Spezifität lt. Literatur	Referenz	Induzierbar
GTEV49 Cre	unbekannter endogener Promotor	ubiquitär im Embryo	Vallier et al, 2001	Tamoxifen
ROSA-Cre	ROSA Locus	ubiquitär	Vooijs et al, 2001	Tamoxifen
MCK-Cre	Muskuläre Kreatinkinase (<i>Promotor erst in der späten Embryonalphase aktiv</i>)	Herz, Muskel	Brüning et al, 1998	nein
MHC-Cre	α -Myosin, schwere Kette	Herz	Minamino et al, 2001	RU486
MerCreMer	α -Myosin, schwere Kette	Herz	Sohal et al, 2001	Tamoxifen

Tabelle 3.2: Übersicht der getesteten Cre Linien

3.9.1 Charakterisierung der GTEV49 Cre-Linie

Diese transgene Cre-Linie besitzt einen *Gene Trap Expression Vektor* (GTEV), der eine Expression von einem endogenen Promotor ermöglicht. Das Cre Rekombinase Protein ist an eine mutierte Östrogenrezeptorbindungsdomäne (CreER^{T2}) fusioniert. Erst durch den synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen wird das Fusionsprotein in den Kern transloziert und so aktiv. Reporterstudien zeigten eine starke, ubiquitäre Cre-vermittelte Exzision im 14 Tage alten Embryo.

Um nun die Cre Aktivität im adulten Tier zu untersuchen, wurde doppelt transgenen Mäusen (*GTEV49 Cre^{tg/+};ACZL^{tg/+}*) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen 2 mg Tamoxifen *i.p.* injiziert und verschiedene Gewebe (Lunge, Milz, Leber, Herz, Gehirn, Skelettmuskel) X-Gal gefärbt. In Abb. 3.20 sind die Gewebe gezeigt, in denen die Cre Rekombinase aktiv war.

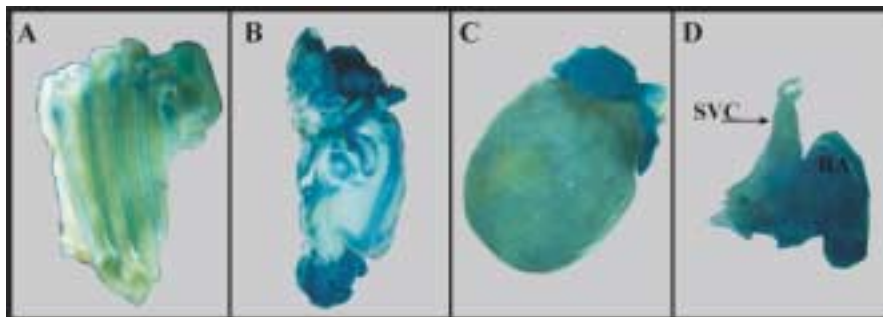


Abbildung 3.20: lacZ Charakterisierung

GTEV49 Cre^{tg/+};ACZL^{tg/+} (A) Brustkorb mit Rippenknochen. (B) Gehirn. (C) Herz. (D) Vena cava superior (SVC) mit rechtem Vorhof (RA)

Die lacZ Analyse zeigt eine schwache und, im Vergleich mit den anderen Linien, untypische Blaufärbung in den Herzventrikeln (Abb. 3.20 C) sowie im rechten Vorhof und V. cava superior (Abb. 3.20 D). Im Schnitt durch den Sinusknoten (Abb. 3.21) erkennt man eine punktierte Färbung des Gewebes, wobei ein Großteil der Myozyten nicht gefärbt zu sein scheint. Möglicherweise beschränkt sich die Färbung auf Bindegewebszellen.

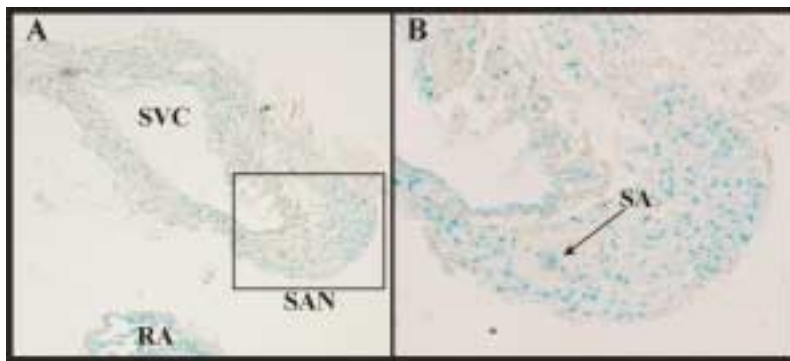


Abbildung 3.21: lacZ Analyse im Schnitt durch den Sinusknoten

GTEV49 Cre^{tg/+};ACZL^{tg/+} 10 µm Gewebeschnitte durch den Sinusknoten. (B) Vergrößerung des Sinusknotens. SAN: Sinusknoten, RA: rechter Vorhof, SA: Sinusknotenarterie

3.9.2 Charakterisierung der MHC-Cre Linie

Bei dieser Linie besitzt das Cre Fusionsprotein eine mutierte Progesteronrezeptor Ligandenbindungsdomäne, die durch das synthetische Antiprogesteron RU486 (Mifepriston) aktivierbar ist. Endogene Steroide haben keinen Einfluss auf die Cre Aktivität. Der vorgeschaltete α -myosin heavy chain (α MHC) Promotor soll eine spezifische Expression im Herzen ermöglichen.

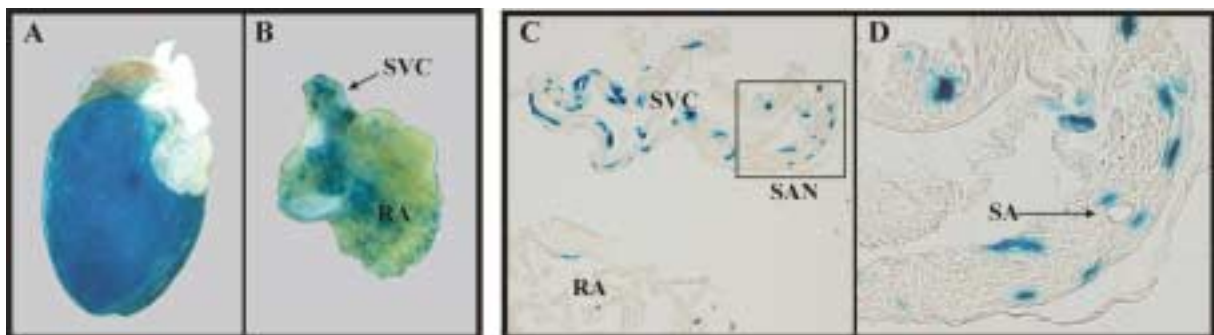


Abbildung 3.22: lacZ Charakterisierung

MHC-Cre^{tg/+};ACZL^{tg/+} X-Gal gefärbtes Herzgewebe. (A) Herz. (B) rechter Vorhof mit Vena cava superior. (C&D) X-Gal gefärbter 10 µm Gewebeschnitt durch den Sinusknoten. (D) Vergrößerung des Sinusknotens. RA: rechter Vorhof, SVC: Vena cava superior, SAN: Sinusknoten, SA: Sinusknotenarterie

Die lacZ Analyse erfolgte nach 5-tägiger *i.p.* Gabe von je 0,6 mg RU468. In den untersuchten Organen (Herz, Leber, Lunge, Milz, Gehirn, Skelettmuskel) zeigte sich nur im Herzen eine durch Cre-vermittelte Exzision hervorgerufene Blaufärbung (Abb. 3.22 A). Es fällt auf, dass die Herzventrikel sehr viel stärker gefärbt sind als die Vorhöfe. Diese verringerte Effizienz wird vor allem bei der isolierten Betrachtung des Sinusknotenareals (Abb. 3.22 B) deutlich. Nur wenige Bereiche der Vena cava superior und des rechten Vorhofes weisen Rekombination auf. Im Schnitt durch den Sinusknoten zeigt sich, dass nur circa 5% der Zellen angefärbt sind (Abb. 3.22 C&D).

3.9.3 Charakterisierung der ROSA Cre-Linie

Es handelt sich hierbei um eine durch Tamoxifen induzierbare, "Cre Knock-in" Mauslinie. Das Cre Fusionsprotein besitzt eine mutierte Östrogenrezeptorbindungsdomäne (ER^T), die nur eine Affinität zu dem synthetischen Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen aufweist. Die Cre Expression steht unter der Kontrolle des endogenen ROSA26 Promotors. Dadurch soll eine ubiquitäre Cre-vermittelte Exzision erreicht werden.

Um die Rekombination zu induzieren, mussten die adulten doppelt-heterozygoten Mäuse ($ROSA^{Cre-ER/+}; ACZL^{tg/+}$) an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit 8 mg Tamoxifen *i.p.* behandelt werden (Vooijs et al, 2001). Das ist, verglichen mit den anderen Linien, eine vierfach höhere Tamoxifendosis. Anschließend wurden Herz, Leber, Lunge, Milz, Gehirn und Skelettmuskel mittels X-Gal Färbung analysiert.

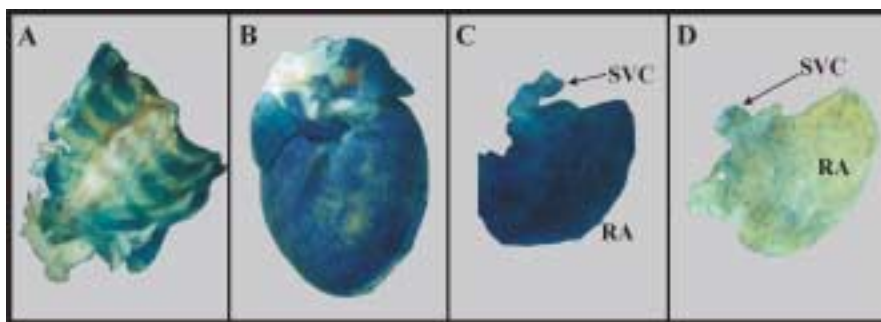


Abbildung 3.23: lacZ Charakterisierung

$ROSA^{Cre-ER/+}; ACZL^{tg/+}$ (A) Skelettmuskel; (B) Herz; (C) Vena cava superior (SVC) und rechter Vorhof (RA); (D) Vena cava superior und rechter Vorhof einer parallel induzierten Maus gleichen Genotyps

Es konnte nur im Skelettmuskel und im Herzen eine Cre-vermittelte Exzision nachgewiesen werden (Abb. 3.23 A&B). Die isolierte Betrachtung der Vena cava superior und des rechten Vorhofs (Abb. 3.23 C) zeigt eine ca. 60%ige Blaufärbung. Beim Versuch dieses Ergebnis zu reproduzieren, fiel eine starke Variabilität zwischen den einzelnen Tieren auf. Abb. 3.23 D

zeigt anhand einer parallel induzierten Maus gleichen Genotyps diese stark unterschiedliche Rekombinationshäufigkeit beispielhaft für den makroskopischen Sinusknotenbereich (Vena cava superior und rechter Vorhof).

3.9.4 Charakterisierung der MCK Cre-Linie

Bei der MCK Cre-Mauslinie steht die Transgen Expression unter der Kontrolle des Muscle Creatin Kinase Promotors. Dieser Skelett- und Herzmuskel spezifischer Promotor ist erst ab Tag 13 der Embryonalentwicklung aktiv (Hong Li et al, 2000).

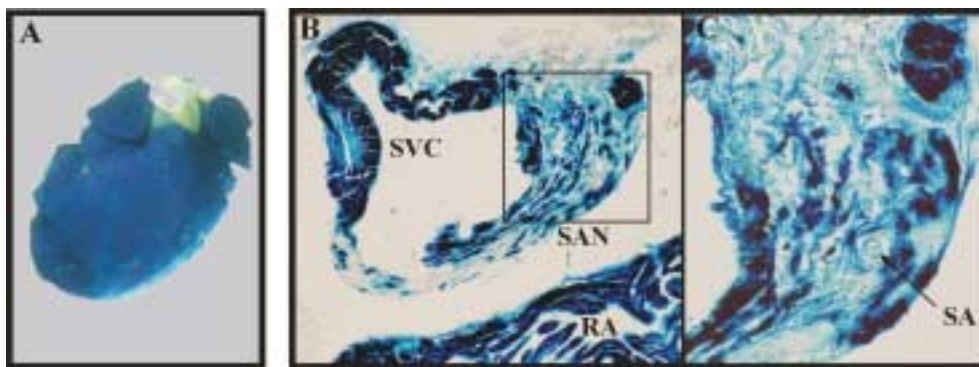


Abbildung 3.24: lacZ Charakterisierung

MCK-Cre^{tg/+},ACZL^{tg/+} (A) X-Gal gefärbtes Herz. (B&C) 10 µm Gewebeschnitte durch den Sinusknoten. (C) Vergrößerung des Sinusknoten. SVC: Vena cava superior, SAN: Sinusknoten, RA: rechter Vorhof, SA: Sinusknotenarterie

Die X-Gal Analyse verschiedener Organe ergab eine spezifische, nahezu vollständige Blaufärbung im gesamten Herz- (Abb. 3.24 A) und Skelettmuskel (nicht gezeigt).

Im Schnitt durch die Sinusknotenregion zeigt sich, dass die meisten Zellen der Vena cava superior und augenscheinlich alle Zellen des rechten Atriums durch Cre-vermittelte Exzision Blau angefärbt werden können (Abb. 3.24 B). In der Vergrößerung wird aber auch deutlich, dass nicht alle Zellen des Sinusknoten rekombiniert sind. Im primären Schrittmacherzentrum liegt vielmehr ein Mosaik vor, bei dem ca. 60- 80% der Zellen blau angefärbt sind.

3.9.5 Charakterisierung der MerCreMer-Linie

Diese transgene Cre-Mauslinie exprimiert ein durch Tamoxifen induzierbares Cre Fusionsprotein, welches zwischen zwei mutierten Östrogenrezeptorbindungsdomänen liegt (MerCreMer). Die Transkription dieses Transgens steht unter der Kontrolle des α -myosin heavy chain (α MHC) Promotors.

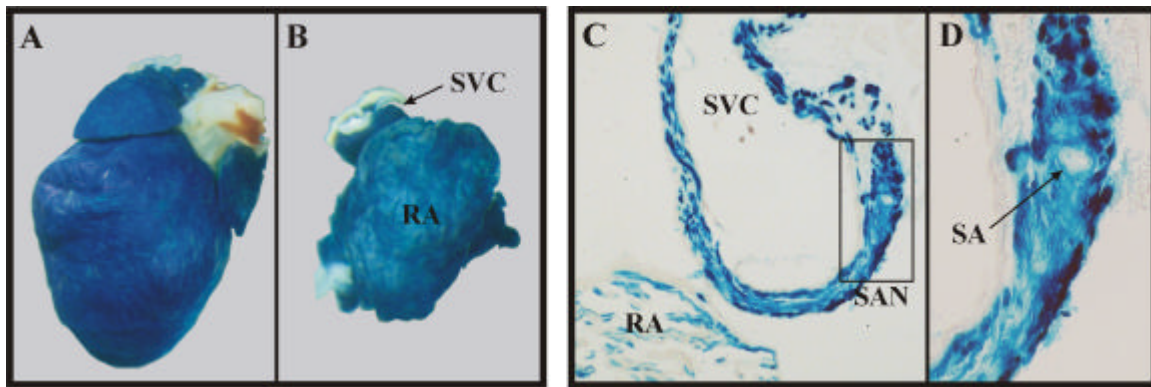


Abbildung 3.25: lacZ Charakterisierung

MerCreMer^{tg/+};ACZL^{tg/+}. (A&B) XGal gefärbtes Herzgewebe. (A) Herz. (B) rechter Vorhof mit Vena cava superior. (C&D) X-Gal gefärbter 10µm Gewebeschnitt durch den Sinusknoten. (D) Vergrößerung des Sinusknoten. RA: rechter Vorhof, SVC: Vena cava superior, SAN: Sinusknoten, SA: Sinusknotenarterie

Die doppelt heterozygoten Mäuse (*MerCreMer*^{tg/+};ACZL^{tg/+}) wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit je 2 mg Tamoxifen *i.p.* behandelt. Von den untersuchten Organen (Herz, Leber, Lunge, Milz, Gehirn, Skelettmuskel) zeigte sich nur im Herzen eine positive lacZ Färbung (Abb. 3.25). Die isolierte Betrachtung des rechten Vorhofes mit zugehöriger SVC lässt auf eine hohe Rekombinationseffizienz schließen. Im Schnitt durch die Sinusknotenregion ist sowohl die Wand der SVC als auch der rechte Vorhof blau gefärbt (C). Die Vergrößerung bestätigt die effiziente Cre-vermittelte Exzision (D). Im Sinusknotenbereich sind nahezu alle Zellen rekombiniert.

Die MerCreMer-Mauslinie verfügt, von allen getesteten Cre-Linien, über die effektivste Cre Aktivität im Sinusknoten. Durch die Verwendung des induzierbaren Systems ist es außerdem möglich, erst im adulten Zustand *loxP* flankierte Gene herauszuschneiden und so einen embryonal letalen Phänotyp zu vermeiden.

3.10 Generierung eines sinoatrialen HCN4-KO mittels der MerCreMer-Mauslinie

Von allen getesteten Cre-Linien war die MerCreMer am besten für die Generierung einer im Sinusknoten HCN4-defizienten adulten Maus geeignet. Die Einkreuzung des induzierbaren MerCreMer-Transgens erfolgte nach einem speziellen Verpaarungsschema (siehe M&M 2.4.4). Von den daraus resultierenden Genotypen wurden im Folgenden drei (Abb. 3.26) für proteinbiochemische Nachweise verwendet.

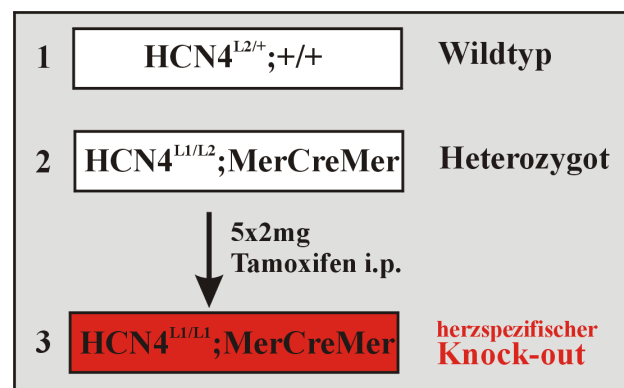


Abbildung 3.26: Verwendete Genotypen

Die Knock-out Tiere wurden im Alter von 5 bis 8 Wochen mit 2 mg Tamoxifen pro Tag an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert. Die Analyse erfolgte dann 4 Wochen nach der letzten Injektion.

3.10.1 Nachweis der HCN4 Proteinreduktion im Sinusknoten

Um die Proteinabnahme im Sinusknoten zu untersuchen, wurden die Knock-out Mäuse mit Kontrollmäusen (Wildtyp und Heterozygot) gleichen Alters verglichen. Als Nachweismethode wurde sowohl die Western-Blot Analyse als auch immunhistochemische Methoden angewandt.

3.10.1.1 Western-Blot Analyse

Die Western-Blot Analyse (Abb. 3.27) zeigt deutliche Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den verschiedenen Genotypen. Im Vergleich zum Wildtyp (Spur 1) nimmt die HCN4 Proteinkonzentration im heterozygoten Sinusknoten (Spur 2) um etwa die Hälfte ab.

Dies lässt sich offensichtlich auf einen Gendosis-Effekt zurückführen. Im Sinusknoten von Tamoxifen injizierten Knock-out Mäusen ist nur noch wenig HCN4 Protein zu detektieren (Spur 3). Der primäre HCN4 Antikörper erkennt nur sehr schwache Banden bei ca. 150 kDa. Verglichen mit dem Wildtyp liegt also im Knock-out eine 85 bis 95%ige Abnahme des HCN4 Proteins vor. Diese Ergebnisse ließen sich in mehreren Ansätzen reproduzieren (n=10 KO Mäuse).

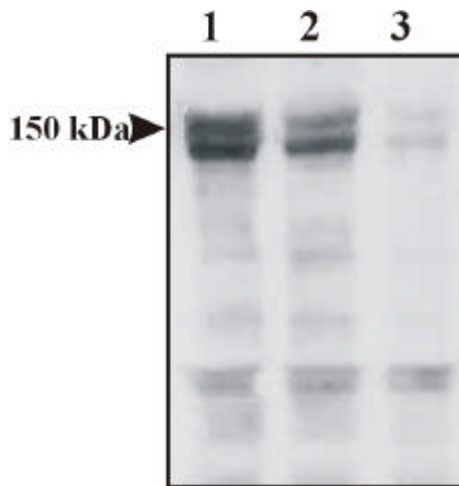


Abbildung 3.27: Western Analyse

Western-Blot mit HCN4 Antikörper inkubiert (1:100). Je 80 µg Sinusknotenprotein aus Wildtyp (1), Heterozygot (2), Knock-out (3). Detektion mittels ECL-System, kDa: Kilodalton

Durch die Western-Blot Analyse konnte die hohe Effizienz der gewählten Strategie zur Deletion im Sinusknoten demonstriert werden. Trotzdem wurde das HCN4 Protein nicht vollständig entfernt. Es bleiben um die 10% Restprotein im Sinusknoten erhalten.

3.10.1.2 Immunhistochemische Analyse

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden jeweils 10 µm dicke Schnittserien angefertigt und mit HCN4 Antikörper inkubiert. In Abb. 3.28 ist in aufeinanderfolgenden Schnittebenen (A, B, C) der Sinusknoten dargestellt. Dabei befindet sich die Ebene A auf der Höhe kurz vor der Einmündung der oberen Hohlvene in das rechte Herzohr. Der Sinusknoten zeigt sich in dieser Ebene als eine kompakte Struktur in der Wand der SVC. In den nachfolgenden Ebenen (B&C) verliert er im Schnitt an Kompaktheit und Größe, und erstreckt sich weiter bis in den rechten Vorhof. Im Wildtyp (oben) erkennt man eine stark ausgeprägte HCN4 Protein Expression, die sich über den ganzen Sinusknoten (A, B, C) erstreckt. Dagegen ist das HCN4 Signal im Gewebeschnitt einer heterozygoten Maus (unten) weniger stark

ausgeprägt, aber dennoch eindeutig nachzuweisen. Der Knock-out (mittig) Sinusknoten zeigt auf den ersten Blick keine positive HCN4 Anfärbung. Erst bei genauerer Betrachtung (siehe Vergrößerung) erkennt man einzelne HCN4 positive Bereiche bzw. Zellen (siehe Pfeile).

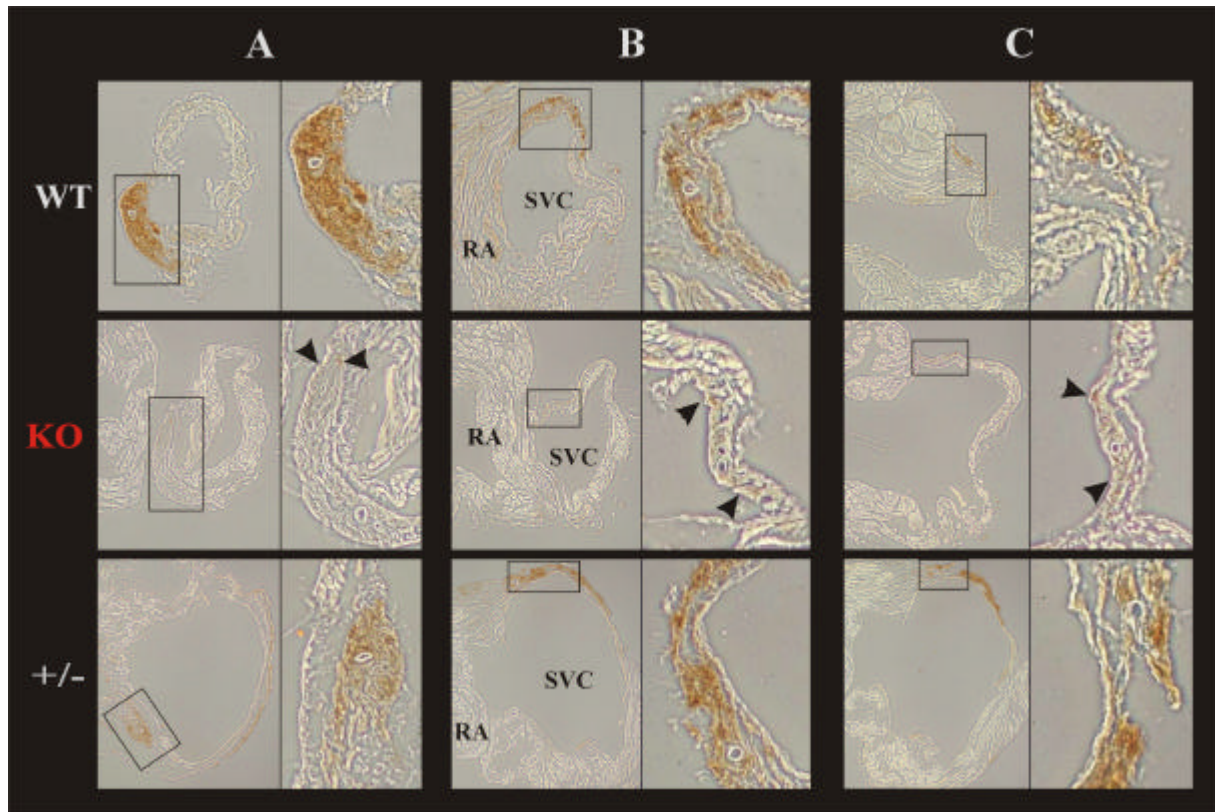


Abbildung 3.28: Immunhistochemische Untersuchung des Sinusknotens

Immunhistochemische Färbung von HCN4 Protein im 10 µm dicken Gewebeschnitt. A-C stellen verschiedene Schnittebenen dar. Die HCN4 positiven Bereiche sind zusätzlich vergrößert dargestellt. Pfeile zeigen im Knock-out einzelne HCN4 positive Zellen. WT: Wildtyp, KO: Knock-out, +/-: Heterozygot; SVC: Vena cava superior, RA: rechter Vorhof. HCN4 Antikörper 1:100 verdünnt, Detektion mittels DAB Reagenz

Das Ergebnis der Immunhistochemie bestätigt die Western-Blot Analyse. Im Knock-out sind ca. 90% der Sinusknotenzellen HCN4-defizient. Dennoch liegt kein vollständiger Sinusknoten Knock-out vor, da noch etwa 10% der Zellen den Kanal exprimieren.

3.11 Vorläufige funktionelle Analyse der adulten sinoatrialen HCN4-KO

Die induzierten KO Mäuse sind phänotypisch unauffällig und können nicht von ihren Geschwistern in ihrem Verhalten unterschieden werden. Erste *in-vivo* EKG Messungen ergaben Bemerkenswerterweise keine offensichtlichen Auffälligkeiten, es konnten keine Rhythmusstörungen oder signifikante Unterschiede in der basalen Herzfrequenz beobachtet werden.

4 Diskussion

HCN-Kanäle sind vermutlich an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt. Unter anderem wird eine Beteiligung an der Schrittmacheraktivität von spontan aktiven Zellen im Gehirn und im Herzen, an der Kontrolle des Ruhemembranpotentials, an der Vermittlung des sauren Geschmacks sowie an neuronaler Plastizität und an dendritischer Integration angenommen (DiFrancesco 1993, Pape 1996, Robinson & Siegelbaum 2003). Über den Beitrag und den Stellenwert der einzelnen HCN-Isoformen zu diesen Funktionen ist nur wenig bekannt, da bis jetzt noch keine selektiven HCN-Kanalblocker zur Verfügung stehen.

Im adulten Sinusknoten ist HCN4 das am stärksten exprimierte HCN Transkript (Shi et al, 1999; Ludwig et al, 1999; Ishii et al, 1999; Moosmang et al, 2001). Jedoch wird die Funktion von HCN-Kanälen im Sinusknoten, nämlich ob diese Kanäle wirklich einen entscheidenden Beitrag zur spontanen langsamen diastolischen Depolarisation leisten, kontrovers diskutiert (Brown, DiFrancesco & Noble 1979; DiFrancesco 1993). Deshalb sollte durch genetische Deletion des HCN4 Gens die Bedeutung dieser HCN Isoform für die Herzfunktion des Säugerorganismus näher untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals mit immunhistochemischen Methoden die HCN4 Proteinexpression sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier dargestellt. Dabei wurde demonstriert, dass HCN4 ein hochspezifischer Marker für das sich entwickelnde und adulte kardiale Reizleitungssystem ist. Die Herstellung und Analyse von HCN4-defizienten Mäusen führte zu dem unerwartetem Resultat, dass die Knock-out Tiere nicht lebensfähig sind und noch während der Embryonalentwicklung im Mutterleib sterben. Weitere Untersuchungen zeigten, dass HCN4 für die Generierung und Modulation der Herzfrequenz essentiell ist und somit eine wichtige Rolle in der embryonalen Herzentwicklung ausfüllt. Schließlich konnte durch zeit- und gewebespezifische Deletion des HCN4 Gens das HCN4 Protein im adulten Sinusknoten drastisch um ca. 90% reduziert werden. Damit wurde die Voraussetzung für die Analyse der Funktion von I_h im Herz des erwachsenen Tieres geschaffen.

4.1 HCN4 in der embryonalen Herzentwicklung

Um die Rolle von HCN4 aufzuklären, haben wir Mäuse generiert, die für diesen Kanal defizient sind. Die ubiquitär HCN4-defizienten Tiere sterben während der frühen embryonalen Entwicklung. Dies ist überraschend, da bei den kürzlich beschriebenen HCN1 und HCN2 Knock-out Mäusen (Ludwig et al, 2003; Nolan et al, 2003) kein letaler Phänotyp auftritt. Damit nimmt HCN4, verglichen mit den anderen HCN Isoformen, eine Sonderstellung während der embryonalen Entwicklung ein.

Durch die Generierung einer herzspezifischen Mutante konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von HCN4 im embryonalen Herzen diesen letalen Phänotyp verursacht. Das embryonale Herz ist das erste Organ, dass während der Embryogenese seine Funktion aufnimmt. In der Maus können ab dem ET 8,0 primitive Herzbewegungen beobachtet werden. Die ersten regelmäßigen Kontraktionen der embryonalen Herzkammer sind ab dem ET 9,0 zu erkennen (Kaufman 1995). Im Herz eines adulten Tieres sollen Schrittmacherkanäle wie HCN4 in der Sinusknotenregion zu einem regelmäßigen Herzschlag beitragen. Unbekannt war jedoch, ob eine derartige spezialisierte Region mit Schrittmacherkanälen auch im frühen embryonalen Herzen vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit konnte im Mausembryo sowohl HCN4 Transkript als auch HCN4 Protein spezifisch in der Wand der rechten und linken gemeinsamen Kardinalvene auf Höhe der Einmündung in den Sinus venosus nachgewiesen werden. Aufgrund früherer rein morphologischer Untersuchungen soll sich in dieser Gegend das frühe embryonale Reizleitungssystem bilden (Viragh & Challice, 1980). Diese These wird durch unsere Untersuchungen untermauert. Denn nur in HCN4 positiven Zellen, die eben ausschließlich in dieser Region des Herzens vorkommen, konnte ein sinusnotenähnliches Schrittmacherpotential abgeleitet werden.

Bis dato standen nur wenige Marker für das sich entwickelnde Reizleitungssystem zur Verfügung. Diese bisher beschriebenen "Markergene" weisen aber meist nur eine unzureichende Spezifität auf oder sind erst in einer späten Phase der Herzentwicklung nachweisbar (Myers & Fishman, 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HCN4 das erste spezifische Markergen für das frühe kardiale Reizleitungssystem darstellt.

Die HCN4-defizienten Tiere sterben zwischen den ET 10,0 und 11,5. Im gleichen Zeitraum entwickelt sich in Wildtyp Kardiomyozyten ein prominenter I_h -Strom. In den Knock-out Zellen ist dieser Strom um 75- 90% verringert. Dies zeigt eindeutig, dass der größte Teil des embryonalen I_h -Stroms im Herzen durch HCN4 und nur ein geringer Teil von anderen

Isoformen generiert wird. Dies korreliert mit Ergebnissen einer japanischen Arbeitsgruppe, die mit RT-PCR Untersuchungen HCN4 als das prädominante HCN Transkript in Kardiomyozyten während der frühen Embryonalentwicklung identifiziert haben (Yasui et al, 2001). Die Tatsache, dass die Herzen der HCN4-defizienten Tiere zwar regelmäßig aber mit einer langsameren basalen Frequenz schlagen lässt vermuten, dass der I_h -Strom bei der Generierung des Schrittmacherpotentials beteiligt ist, selbst wenn ein langsamer Grundherzschlag auch ohne I_h aufrecht erhalten werden kann.

Im adulten Tier bewirkt eine β -adrenerge Stimulation eine Zunahme der Herzfrequenz. Es wird angenommen, dass diese Stimulation teilweise durch eine direkte Modulation der HCN-Kanäle im Sinusknoten via cAMP vermittelt wird (DiFrancesco et al, 1993). Untersuchungen zur Modulation der Herzfrequenz im Embryo lagen bisher nicht vor. Im Wildtyp Embryo konnte die Kontraktionsfrequenz ganzer isolierter Herzen und die isolierter Kardiomyozyten durch Zugabe von cAMP stimuliert werden. Diese Stimulation ist offensichtlich vom Vorhandensein des HCN4-Kanals abhängig, da in Knock-out Mäusen, die diesen Kanal nicht besitzen, weder die Kontraktionsfrequenz der ganzen embryonalen Herzen noch die der isolierten Kardiomyozyten gesteigert werden konnte.

Von isolierten Kardiomyozyten wurden spontane Aktionspotentiale aufgezeichnet. Dabei konnten verschiedene Aktionspotentialtypen, abhängig vom Entwicklungsstadium, registriert werden. Die Aktionspotentiale ähneln in ihren elektrophysiologischen Charakteristika den Typen, die während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu pulsierenden Kardiomyozyten in *embryoid bodies* gefunden wurden (Hescheler et al, 1997). Ab dem ET 9,0 findet man sowohl im Wildtyp als auch im Knock-out Tier Kardiomyozyten, die vorhofähnliche und ventrikelähnliche AP aufweisen. Diese werden wahrscheinlich wie im adulten Vorhof und Ventrikel durch das Zusammenspiel verschiedener Ionenströmen, wie I_{Na} , I_{Ca} , I_K , I_{K1} , I_{to} , I_{KACh} , I_{KATP} generiert. HCN4 scheint hierbei keinen Beitrag zu leisten.

Die echten Schrittmacher unter den embryonalen Herzzellen beginnen mit einem "primitiven" Aktionspotential, dass wahrscheinlich nur durch zwei Ionenströmen $I_{Ca,L}$ und $I_{K,to}$; (Hescheler et al, 1997), oder nur durch intrazelluläre Calcium Oszillation generiert wird (Viatchenko-Karpinski et al, 1999). Diese primitiven Aktionspotentiale sind ausreichend, um das kleine embryonale Herz zu einem frühen Zeitpunkt anzutreiben. Im Gegensatz zu diesen Aktionspotentialen, die sowohl in HCN4^{+/+}- als auch in HCN4^{-/-}-Herzen vorhanden waren, konnten "reife" sinusknotenähnliche Aktionspotentiale, welche ab ET 9,0 auftreten, nur in

Wildtyp und zu keinem Zeitpunkt in Knock-out Kardiomyozyten detektiert werden. Dieses Ergebnis demonstriert die essentielle Rolle, die HCN4 während der Entwicklung des kardialen Reizleitungssystems besitzt. Fehlt der HCN4-Kanal, so können keine sinusnotenähnlichen Schrittmacherpotentiale generiert werden.

Die Tatsache, dass in den HCN4-defizienten Embryonen keine sinusnotenähnlichen Schrittmacherpotentiale generiert werden, lässt zwei unterschiedliche Interpretationen zu:

(1) Die Generierung von embryonalen sinusnotenähnlichen Schrittmacherpotentialen unterliegt dem Zusammenspiel verschiedener Ionenströme, wie I_{Ca} , I_K , I_{to} , I_{KAch} und I_h (Hescheler et al, 1997). Im Unterschied zum Wildtyp fehlt im Knock-out der HCN4 Kanal und somit der größte Anteil des I_h -Stroms (ca. 85%). Aufgrund des stark reduzierten I_h ist die reife Schrittmacherzelle nicht mehr in der Lage sinusnotenähnliche Aktionspotentiale zu generieren.

Diese These legt dem I_h -Strom eine essentielle Rolle bei der Generierung von Schrittmacherpotentialen nahe. Dagegen sprechen allerdings Studien mit I_h -Blockern am adulten Sinusknoten. Diese Studien zeigen, dass Sinusknotenzellen, bei denen I_h blockiert wird, zwar eine verlangsamte diastolische Depolarisation aufweisen aber trotzdem weiterhin in der Lage sind spontane Aktionspotentiale zu generieren (Stieber et al, 2004).

(2) In den HCN4-defizienten Tieren sind keine reifen Schrittmacherzellen vorhanden. Daher können auch keine sinusnotenähnlichen Schrittmacherpotentiale detektiert werden.

Dies impliziert, dass der HCN4 Kanal bei der Differenzierung von embryonalen Kardiomyozyten zu Zellen des kardialen Reizleitungssystems eine wichtige Rolle spielt. Im Säugetier sind die Faktoren, die die Differenzierung des Reizleitungssystems steuern weitgehend unbekannt. Als wichtiger "second messenger" kann Calcium in Differenzierungsprozesse eingreifen. Porter & Kollegen konnten am Herz eines Mausembryos zeigen, dass die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren während der kardialen Embryonalentwicklung durch intrazelluläres Calcium beeinflusst wird (Porter et al, 2003). Intrazelluläres Calcium könnte ebenso an der Differenzierung des kardialen Reizleitungssystems beteiligt sein. Interessanterweise wurde kürzlich eine Studie veröffentlicht, die einen geringen, aber messbaren Calciumeinstrom durch den aktivierten HCN4-Kanal aufzeigt (Yu et al, 2004). Vielleicht könnte HCN4 im Mausembryo dadurch die Schrittmacherzell-Differenzierung beeinflussen.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein um aufzuklären, welche der oben genannten Möglichkeiten zutrifft.

Die funktionelle Korrelation zwischen dem frühen embryonalen Tod und der Inaktivierung des HCN4-Kanals im Herzen ist nicht völlig klar. Histologische Untersuchungen zeigten keine Auffälligkeiten im Bereich der Herzanlage. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Tiere nicht aufgrund struktureller, sondern aufgrund funktioneller kardialer Defekte sterben. Der Knock-out ist nicht in der Lage, funktionell ausgereifte Schrittmacherzellen zu bilden. Anfangs kann dieser Defekt wahrscheinlich von anderen spontanen Kardiomyozyten teilweise kompensiert werden. Zu späteren Zeitpunkten reichen dann möglicherweise die langsamen Herzkontraktionen, hervorgerufen nur durch primitive und vorhofähnliche Aktionspotentiale, nicht mehr aus, um den sich entwickelnden Embryo mit genügend Blut zu versorgen. Bedenkt man, dass ein Mausembryo zwischen den ET 10.0 und 11.5 mehr als die Hälfte an Körpergröße zunimmt, so ist es nicht unwahrscheinlich, dass ein eingeschränkt funktionierendes Herz nicht mehr in der Lage ist, die nötige Versorgung zu leisten.

4.2 HCN4 im Herz des erwachsenen Tieres

Der I_h -Strom wurde erstmals 1976 im Sinusknoten von Noma & Irisawa beschrieben. Auf Transkriptebeine ist HCN4 der am stärksten im Sinusknoten exprimierte I_h -Kanalsubtyp (Moosmang et al, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte zum erstenmal auch auf Proteinebene der HCN4-Kanal im Sinusknoten nachgewiesen werden. Die immunhistochemisch gefärbten Sinusknotenschnitte lassen, wie im Embryo, ein hohes Maß an Spezifität in der Proteinverteilung erkennen. Nur die Sinusknotenregion zeigt ein positives HCN4 Signal, in anderen unmittelbar angrenzenden Regionen wie der Gefäßwand der Vena cava superior oder der Vorhofmuskulatur kann kein HCN4 Protein detektiert werden. Immunhistochemische Untersuchungen auf Einzelzellebene belegen, dass der HCN4-Kanal ausschließlich in Sinusknotenzellen exprimiert wird. Im Sinusknoten sind Spider- und Spindelzelltypen vorhanden. Es wird angenommen, dass die Sinusknotenzellen vom Spidertyp die primären Schrittmacherzellen im zentralen Knoten darstellen, während die Zellen vom Spindeltyp mehr in der Peripherie zu finden sind (Wu et al, 2001). Sowohl in Spider- als auch in Spindelzellen konnte HCN4 Protein identifiziert werden. Dies spricht für eine ubiquitäre Verteilung im ganzen Sinusknotenbereich (zentral und peripher).

Abgesehen von der starken HCN4 Expression im Sinusknoten konnte auch zum ersten Mal HCN4 im AV-Knoten der Maus nachgewiesen werden. Ebenso wie die Sinusknotenzellen sind auch die Zellen des AV-Knoten spontan aktiv. Untersuchungen am Kaninchen zeigten einen ausgeprägten I_h -Strom, vor allem in den AV-Zellen, die eine hohe Schrittmacheraktivität aufweisen. Eine kürzlich erschienene Studie konnte darüber hinaus Anreicherungen von HCN4 Protein im Kaninchen AV-Knoten nachweisen. Die Autoren konnten zudem noch zeigen, dass bei Blockierung des I_h -Stroms mit Cs^+ die Schrittmacheraktivität im AV-Knoten signifikant (über 30%) verlangsamt wird (Dobrzynski et al, 2003).

Vieles spricht deshalb dafür, dass auch im Maus AV-Knoten die HCN-Kanäle, insbesondere HCN4, zur Schrittmacheraktivität beitragen. Mit der in dieser Arbeit etablierten Knock-out Strategie sollte es möglich sein, die spezifische Rolle von HCN4 im AV-Knoten aufzuklären.

Im adulten Herzen konnten auch auf den Herzklappen der Pulmonalarterie HCN4 positive Zellen mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden. Aus früheren Studien ist bekannt, dass auch auf den Herzklappen Zellen existieren, die spontane Schrittmacheraktivität zeigen (Bassett et al, 1976; Rozanski et al, 1986).

Diese Ergebnisse veranschaulichen das außergewöhnliche kardiale Expressionsprofil von HCN4. In der vorliegenden Arbeit konnte HCN4 Protein in Sinuskotenzellen, in Zellen des AV-Knoten und auf der Herzklappe eindeutig nachgewiesen werden. HCN4 wird demnach ausschließlich in Zellen exprimiert, die spontane Schrittmacheraktivität aufweisen. Außerdem repräsentiert HCN4 in solchen Zellen die dominante HCN Isoform. Diese Ergebnisse werden komplettiert durch Studien am Hundeherz, hierbei konnte auch in den spontan aktiven Purkinje Fasern HCN4 Transkript als prädominante HCN Isoform nachgewiesen werden (Shi et al, 2000). Somit zeigt sich, dass HCN4 in sämtlichen Herzregionen, die spontane Aktivität aufweisen, stark und spezifisch exprimiert wird.

4.3 Die Funktion von HCN4 im Sinusknoten

Trotz der spezifischen Verteilung kann man über die physiologische Funktion von HCN4 im Sinusknoten nur spekulieren. Vor allem durch Untersuchungen an zahlreichen Knock-out Modellen ist klar geworden, dass eine ausgeprägte Expression in einem bestimmten Zelltyp

noch kein Garant für eine offensichtliche Funktion in diesem ist. Dies gilt auch umgekehrt. Ein Beispiel dafür ist der L-Typ Kalziumkanal $\text{Ca}_v1.3$. Dieser ist im Sinusknoten und im Vorhof nur minimal zu detektieren (Bohn et al, 2000), trotzdem zeigen Mäuse, die für diesen Kanal defizient sind, eine Sinusknotenfehlfunktion (Platzer et al, 2000).

Auffällig an HCN4 ist jedoch, dass dieser Kanal sowohl im Embryo als auch im adulten Tier im selben funktionellen Gewebekompartiment, nämlich dem Schrittmacherzentrum des Herzens, als dominante HCN Isoform spezifisch exprimiert wird. Im Embryo konnte gezeigt werden, dass HCN4 für die Generierung und für die Modulation von funktionellen Schrittmacherpotentialen essentiell ist. Die konservierte spezifische Expression im adulten Tier könnte für ähnliche physiologische Aufgaben im adulten Sinusknotengewebe sprechen. Gegen diese These sprechen auf den ersten Blick die vorläufigen funktionellen Analysen der herzspezifischen MerCreMer Knock-out Maus. Bisher zeigen sich in der *in-vivo* EKG Messung keine signifikanten Unterschiede zwischen Knock-out und Wildtyp. Durch die Einkreuzung der MerCreMer Maus konnte zwar eine HCN4 Proteinreduktion um ca. 90% erreicht werden, doch ist eben diese Reduktion nicht vollständig. Dies ist besonders im Sinusknotengewebe von Bedeutung, da man davon ausgeht, dass nur etwa 1% der Sinusknotenzellen die "*leading pacemaker site*" bilden (Boyett, Honjo & Kodama 2000). Von dort aus breiten sich die Aktionspotentiale über den ganzen Sinusknoten und anschließend über das weitere Herz aus. So könnte es sein, dass die etwa 10% Sinusknotenzellen, die in der MerCreMer-KO Maus noch HCN4 besitzen, ausreichen um die basale Funktion im SAN aufrecht zu halten. Möglicherweise kommt es deshalb bisher zu keinen Unterschieden im EKG.

Weitere eingehendere physiologische Untersuchungen an der MerCreMer-KO Maus sind notwendig, um hierzu abschließend Stellung zu nehmen. Es ist bekannt, dass sympathische oder parasympathische Stimulation sowie Pharmaka wie Noradrenalin, Nifedipin oder Acetylcholin die "*leading pacemaker site*" innerhalb des Sinusknoten verschieben können (Opthof 1988). So könnten beispielsweise pharmakologische Stressversuche und Belastungs-EKGs zu Unterschieden zwischen Knock-out und Wildtyp führen, die unter basalen Bedingungen nicht zu erkennen sind. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele für durch Pharmaka oder Stress induzierte kardiale Phänotypen. So zeigen FKBP12.6-defiziente Mäuse erst nach starker körperlicher Belastung Unterschiede im EKG, die sogar bis zum plötzlichen Herztod führen (Wehrens et al, 2003).

4.4 Ausblick

Weitere Studien sind nötig, um für die Rolle von HCN4 während der autonomen Herzaktion ein größeres Verständnis zu bekommen. Die funktionelle Analyse der MerCreMer-KO Maus könnte hierbei wichtige Hinweise liefern. Die EKG Untersuchungen sollen durch den Einsatz von Pharmaka und / oder Stressversuchen (wie oben beschrieben) erweitert und intensiviert werden.

Um den Beitrag von HCN4 zum sinoatrialen I_h -Strom zu ermitteln, müssen die Stromdichten zwischen WT und HCN4-defizienten Sinusknotenzellen verglichen werden. Analysen spontaner Aktionspotentiale, aufgezeichnet von HCN4^{+/+}- und HCN4^{-/-}-Zellen, könnten zu weiteren Einblicken in die Funktion von HCN4 während der langsamen diastolischen Depolarisation führen. Dabei ist bei allen elektrophysiologischen Messungen darauf zu achten, dass auch wirklich das HCN4 Gen aus den zu analysierenden Zellen deletiert wurde, was aufgrund des unvollständigen sinoatrialen Knock-out ein Problem darstellt. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, könnte eine spezielle Reporterlinie in die HCN4-MerCreMer-KO Maus eingekreuzt werden. Diese Z/EG Reporterlinie (Novak et al, 2000) besitzt die Eigenschaft, dass alle Zellen, in denen die Cre Rekombinase aktiv war, EGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimieren und daher nach Anregung mit UV-Licht grün leuchten. Somit kann während der elektrophysiologischen Messung eindeutig erkannt werden, welche Zellen zu HCN4^{-/-}-Zellen rekombiniert haben und dann diese gezielt "gepatcht" werden.

Die unvollständige Rekombination im Sinusknoten der HCN4-MerCreMer-KO Maus erschwert die funktionelle Analyse. Daher ist es mit Sicherheit sinnvoll, weitere Cre-Linien zu charakterisieren oder zu entwickeln, die eine vollständige HCN4 Deletion im Sinusknoten ermöglichen. Als vielversprechend könnte sich hierbei die Generierung einer Mauslinie erweisen, bei der die Cre Rekombinase unter dem HCN4 Promotor induzierbar exprimiert wird. So könnte möglicherweise spezifisch der HCN4-Kanal aus dem kardialen Reizleitungssystem effektiv entfernt werden.

Als sekundäres Erregungsbildungszentrum ist neben dem Sinusknoten der AV-Knoten ein Ziel weiterer Studien. Um das HCN4 Gen aus den Zellen des AV-Knotens zu deletieren, könnte eventuell die MerCreMer oder die MCK Cre-Linie, die eine sehr hohe Effizienz im Vorhof aufweist, verwendet werden. Nach erfolgreicher, durch die Immunhistochemie bestätigter Deletion, könnte der Beitrag von HCN4 an der Rhythmusgenerierung im AV-Knoten analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Seit der ersten Charakterisierung des I_h -Stroms wird dessen Funktion im Herzen, insbesondere während der langsamen spontanen Depolarisation im Sinusknoten kontrovers diskutiert. 1998 gelang es mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, die entsprechenden Gene zu identifizieren, die für die I_h -Kanäle kodieren. Diese HCN-Genfamilie umfasst 4 Isoformen, wobei jede Isoform ein spezifisches Expressionsmuster besitzt. Im Säugetiersinusknoten konnte auf Transkriptebeine gezeigt werden, dass HCN4 die dominante HCN Isoform darstellt.

Um die physiologische Funktion von HCN4 aufzuklären wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse generiert und analysiert, die für diese HCN Isoform defizient sind.

Es konnte gezeigt werden, dass HCN4 für die Funktion des sich entwickelnden kardialen Reizleitungssystems essentiell ist. Im Wildtyp Embryo wird HCN4 Transkript und Protein in der Region exprimiert, in der sich der Sinusknoten entwickelt. Mäuse die für den HCN4-Kanal ubiquitär oder herzspezifisch defizient sind, sterben zwischen ET 10,0 und 11,5. Histologische Untersuchungen an den HCN4-defizienten Tieren zeigten keine offensichtlichen morphologischen Defekte. Im Durchschnitt ist I_h in den Knock-out Kardiomyozyten um 85% reduziert. Die Herzen der HCN4-defizienten Mäuse schlagen signifikant langsamer als die von Wildtypen und können durch cAMP nicht stimuliert werden. Sowohl in Wildtypen als auch in HCN4^{-/-}-Mäusen konnten Kardiomyozyten mit einem "primitiven" Schrittmacherpotential detektiert werden. Hingegen sind Zellen mit einem ausgereiften Schrittmacherpotential, die im Wildtyp ab ET 9,0 auftreten, nicht im Knock-out zu finden. Deshalb ist der HCN4-Kanal für die Bildung von Schrittmacherpotentialen im sich entwickelnden Sinusknoten essentiell.

Im adulten Tier wird HCN4 ausschließlich in Herzregionen exprimiert die spontane Aktivität aufweisen. Proteinexpression wurde sowohl im ganzen Sinusknoten als auch in isolierten Sinusknotenzellen, im AV Knoten und auf den Herzklappen nachgewiesen. Wegen der embryonalen Letalität des globalen HCN4 Knock-outs wurden mit Hilfe des Cre *loxP* Systems herzspezifische HCN4-defiziente Tiere hergestellt. Nach genauer Analyse von fünf verschiedenen Cre Transgenen konnte schließlich mit Hilfe der induzierbaren MerCreMer Maus die HCN4 Expression im Sinusknoten um etwa 90% reduziert werden. Mit diesen Tieren sollte es möglich sein, die Rolle von I_h im Herz zu untersuchen. Vorläufige *in-vivo* EKG Messungen ergaben aber Bemerkenswerterweise bisher noch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und der herzspezifischen HCN4-MerCreMer-KO Maus.

6. Anhang

6.1 Primer

Alle Primer der folgenden Tabellen wurden bei der Firma MWG Biotech bezogen. Die Arbeitslösungen der PCR-Primer waren auf 25 pmol/μl, die der Sequenzierprimer auf 0,8 pmol/μl eingestellt. „f“ steht für *forward*- und „r“ für *reverse*.

Primer	Gen/Bindungsstelle	Sequenz 5'-3' Richtung
HCN428R	HCN4 Intron 4 r	CAGGGAGGACTGGCCATAACTAT
HCN439F	HCN4 Intron 3 f	CACCCAAAAGGAGGACAGTGAAGT
HCN440F	HCN4 Exon 4 f	CTGCCCTCATCCAGTCGCTAGAC
HCN442F	HCN4 Exon 3 f	GTACGCATCGTGAACCTCATTG
HCN443R	HCN4 Exon 6 r	TTTCGGCAGTTAAAGTTGATG
HCN103F	HCN1 Exon 7 f	GTCGTCTTTACTCCCTTTTCG
HCN733R	HCN1 Exon 8 r	AGGCTGCTGCATGAGTGACA
HCN221F	HCN2 Exon 3 f	ATGCGCATCTGTAACCTGATCA
HCN220R	HCN2 Exon 6 r	TTCCGGCAGTTGAAGTTCACA
HCN303F	HCN3 Exon 1 f	GCAGCCACAAAGCAGTAGAAATC
HCN903R	HCN3 Exon 2 r	GCATCTAGTCGTGGCTCCA
Cre 800	Cre	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG
Cre1200	Cre	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC
MerCreMer up	MerCreMer	GTCTGACTAGGTGTCCTTCT
MerCreMer down	MerCreMer	CGTCCTCCTGCTGGTATAG
RF79	LacZ	CGCCGACGGCACGCTGATTG
RF80	LacZ	GTTTCAATATTGGCTTCATC

Tabelle 6.1: Verwendete Primer

6.1.1 Für die Genotypisierung verwendete Primer:

Mauslinie	Primer	Größe des Amplikons
HCN4	HCN428R + HCN439F + HCN440F	WT: 397 bp KO:309 bp
Cre Linien (MLC2a, GTEV49, ROSA, MHC, MCK)	Cre 800 + Cre1200	400 bp
MerCreMer	MerCreMer up + MerCreMer down	510 bp
ACZL	RF79 + RF80	300 bp

Tabelle 6.2: Primer für Genotypisierung

6.1.2 Für Sequenzierung/ cDNA-Amplifikation verwendeten Primer

Gen	Primer	Größe des Amplikons
HCN4	HCN442F + HCN443R	WT: 517 bp KO: 299
HCN1	HCN103F + HCN733R	531 bp
HCN2	HCN221F+ HCN220R	517 bp
HCN3	HCN303F + HCN903R	404 bp

Tabelle 6.3: Primer für Sequenzierung/ cDNA-Amplifikation

6.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung/ Verdünnung	Referenz
HCN4 Peptidantikörper	Kaninchen polyklonal	Westernblot und Immunhistochemie/1:100	Moosmang et al, 2001
Cx43 Peptidantikörper	Maus monoklonal	Immunhistochemie/1:500	Chemicon
Anti-Kaninchen/ Meerrettichperoxidase	Ziege polyklonal	Westernblot/1:100000	Dianova
Anti-Kaninchen/ biotinyliert	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:200	Vectastain
Anti-Kaninchen/Cy3	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:500	Dianova; #111-165-144
Anti-Maus/Cy2	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:150	Dianova; #115-225-146

Tabelle 6.4: Verwendete Antikörper

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, et al. 1997. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* 25: 1766-73
- Bassett A, Fenoglio JJ, Wit A, Myerburg R, Gelband H. 1976. Electrophysiologic and ultrastructural characteristics of the canine tricuspid valve. *Am J Physiol* 230(5): 1366-73
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F. 1999. Structure and function of cyclic nucleotide gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:151-71
- Birnboim H, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid. *Nucl Acids Res* 7: 1513-8
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. 2000. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 481: 73-6
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I. 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 47: 658-87
- Brown H, DiFrancesco D. 1980. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 308: 331-51
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280: 235-6
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, et al. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2: 559-69
- Chen S, Wang J, Siegelbaum S. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117: 491-504
- Chirgwin J, Przybyla A, Macdonald R, Rutter W. 1979. Isolation of biologically active RNA from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-9
- de Rooij J, Zwartkruis F, Verheijen M, Cool R, Nijman S, et al. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-7
- DiFrancesco D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55: 455-72
- DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-7
- Dobrzynski H, Nikolski V, Sambelashvili A, Greener I, Yamamoto M, et al. 2003. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res* 93 (11): 1102-10

- Doyle D, Cabral J, Pfuetzner R, Kuo A, Gulbis J, et al. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77
- Feinberg A, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6 – 13
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-7
- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, et al. 1997. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36: 149-62
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-9
- Kaufmann MH. 1998. The atlas of mouse development (second printing).
- Kyhse-Anderson J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem Biophys Methods* 10: 203-7
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15: 680-5
- Li H, Wang J, Wilhelmsson H, Hansson A, Thoren P, et al. 2000. Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3467-72
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, et al. 2003. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo J* 22: 216-24
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F. 1997. Regional expression and cellular localisation of the alpha 1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neuroscience* 17: 1339-49
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. 1999. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 9: 179-86
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo J* 18: 2323-9
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-91
- Mannikko R, Elinder F, Larsson HP. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419: 837-41
- Minamino T, Gaussen V, DeMayo FJ, Schneider MD. 2001. Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein. *Circ Res* 88: 587-92

- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 1999. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380: 975-80
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646-52
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, et al. 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278: 43781-6
- Munk A, Adjemian R, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. 1996. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol* 493 Pt 3: 801-18
- Munsch T, HC. P. 1999. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J Physiol* 519 Pt 2: 493-504
- Myers DC, Fishman GI. 2003. Molecular and functional maturation of the murine cardiac conduction system. *Trends Cardiovasc Med* 13: 289-95
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, et al. 2003. The Hyperpolarization-Activated HCN1 Channel Is Important for Motor Learning and Neuronal Integration by Cerebellar Purkinje Cells. *Cell* 115: 551-64
- Novak A, Guo C, Yang W, Nagy A, Lobe CG. 2000. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28: 147-55
- Opthof T. 1988. The mammalian sinoatrial node. *Cardiovasc Drugs Ther* 1(6): 573-97
- Pape HC. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299-327
- Pfeifer A, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F. 1999. cGMPdependent protein kinases: Structure and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 105-50
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, et al. 2000. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102(1): 89-97
- Porter GA, Jr., Makuck RF, Rivkees SA. 2003. Intracellular calcium plays an essential role in cardiac development. *Dev Dyn* 227: 280-90
- Robinson RB, Siegelbaum SA. 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu Rev Physiol* 65: 453-80
- Roswell DF, White EH. 1978. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol* 57: 409-23
- Rozanski G, Jalife J. 1986. Automaticity in atrioventricular valve leaflets of rabbit heart. *Am J Physiol* 250(3 Pt 2): H397-406

- Saiki K, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, et al. 1988. A primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold spring Harbor Laboratory* Cold spring harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, et al. 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-29
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. 2002. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 90: 939-50
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, et al. 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85: e1-6
- Shi W, Yu H, Wu J, Zuckerman J, Wymore R. 2000. The distribution and prevalence of HCN isoforms in the canine heart and their relation to the voltage dependence of I_f . *Biophys J* 78: 353A (Abstr.)
- Simmons D, Arriza J, Swanson L. 1989. A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Histotech* 12(3): 169-81
- Smith P, Baukrowitz T, Yellen G. 1996. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379: 833-6
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, et al. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 89: 20-5
- Southern E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, et al. 2003. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15235-40
- Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. 2004. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* 14: 23-8
- Trudeau M, Warmke J, Ganetzky B, Robertson G. 1995. Herg, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269: 92-5
- Vallier L, Mancip J, Markossian S, Lukaszewicz A, Dehay C, et al. 2001. An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2467-72

- Vassalle M. 1995. The pacemaker current (I_f) does not play an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 30: 309-10
- Viatchenko-Karpinski S, Fleischmann BK, Liu Q, Sauer H, Gryshchenko O, et al. 1999. Intracellular Ca²⁺ oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8259-64
- Viragh S, Challice CE. 1980. The development of the conduction system in the mouse embryo heart. *Dev Biol* 80: 28-45
- Vooijs M, Jonkers J, Berns A. 2001. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2: 292-7
- Wainger B, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum S, Tibbs G. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-10
- Wang J, Chen S, Siegelbaum S. 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118: 237-50
- Wehrens X, Lehnart S, Huang F, Vest J, Reiken S, et al. 2003. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113(7): 829-40
- Wettschureck N, Rutten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, et al. 2001. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphan1 in cardiomyocytes. *Nat Med* 7: 1236-40
- Wu J, Schuessler R, Rodefeld M, Saffitz J, Boineau J. 2001. Morphological and membrane characteristics of spider and spindle cells isolated from rabbit sinus node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1232-40
- Xue T, Marban E, Li R. 2002. Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res* 90: 1267-73
- Yanagihara K, Irisawa H. 1980. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch* 385: 11-9
- Yasui K, Liu W, Opthof T, Kada K, Lee JK, et al. 2001. I_f current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res* 88: 536-42
- Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z. 2004. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1051-6
- Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. 2001. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 276: 6313-9

6.2 Eigene Veröffentlichungen

Herrmann S, Stieber J, Feil S, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A 2003. Pacemaker channel HCN4 is required for normal cardiac function in the mouse embryo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* 367 (Suppl1): R91

Ludwig A, Stieber J, Moosmang S, Herrmann S, Biel M, Hofmann F. HCN channels: From Genes to Function. In: Cardiac electrophysiology: From Cell to Beside, 4th edition, eds. D.P. Zipes & J. Jalife, W.B. Saunders Company, USA, in press

Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, et al. 2003. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15235-40

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Andreas Ludwig hat mit seiner fachlichen Unterstützung und regem Interesse entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die Geduld und die hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die Berichterstattung vor der Fakultät.

Frau Dr. Juliane Stieber danke ich herzlichst für ihr Interesse an embryonalen Herzen und vor allem für die hervorragende elektrophysiologische Arbeit.

Frau Astrid Vens und Frau Susanne Papparisto gilt mein Dank für die fröhliche Unterstützung im alltäglichen Laborbetrieb. Vor allem Astrid hat mir in den letzten Monaten durch zahlreiche Genotypisierungen viel Arbeit abgenommen.

Allen Mitarbeitern und Kollegen des "zweiten Stocks" (Man, Nicole, Sven, Nicki, Georg und die, die ich vergessen habe), danke ich für das angenehme Arbeitsklima, für wissenschaftliche sowie auch für weniger wissenschaftliche Diskussionen und für gesellige Aktivitäten abseits des Laboralltags.

Frau Günther, Herrn Sahiner und Herrn Pavel danke ich für die Betreuung der Mäuse im Tierstall.

Ein Dankeschön an alle anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Frau Florine Falkenstein danke ich für das Verständnis und den Rückhalt der letzten Jahre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, danke für alles.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 21. April 1974, in Nürnberg

Schule

1980- 1984

Grundschule Heuchling, Lauf a.d. Pegnitz

1984- 1994

Christoph-Jacob-Treu-Gymnasium Lauf, Lauf a.d. Pegnitz
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

April 1995- April 1999

Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

1. Staatsexamen: März 1997

2. Staatsexamen: April 1999

3. Staatsexamen: Juli 2000

Approbation als Apotheker: Juli 2000

Praktika

Famulatur:

September 1995- November 1995

Bahnhof-Apotheke, Lauf

Pharmazeutisches Praktikum:

Mai 1999- November 1999

SmithKline Beecham Pharma in München

November 1999- April 2000

Apotheke im Karl-Albrecht Hof in München

Tätigkeit als Apotheker

Mai 2000- Januar 2001

Apotheker in der Apotheke im Karl-Albrecht Hof
München

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Januar 2001

wissenschaftlicher Angestellter am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie der TU München
bei Prof. F. Hofmann